



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, especialidade de Biologia Molecular
em Medicina Tropical e Internacional

ESTUDOS DA VARIABILIDADE DOS NÍVEIS DE
EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
METABOLIZAÇÃO DE ANTIMALÁRICOS
EM *MUS MUSCULUS*

ANA CARINA COUTINHO BALDINO

2008



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**ESTUDOS DA VARIABILIDADE DOS NÍVEIS DE
EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
METABOLIZAÇÃO DE ANTIMALÁRICOS
EM *MUS MUSCULUS***

ANA CARINA COUTINHO BALDINO

*Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de
Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional.*

Orientador:

Prof. Doutor Virgílio do Rosário

Co-Orientador:

Doutora Dinora Lopes

2008

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT) do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) e para que o mesmo se concretizasse foi fundamental o apoio e colaboração de diversas pessoas, às quais quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Doutora Dinora Lopes pela supervisão técnica e científica, apoio, companheirismo e amizade, fundamentais para a realização do trabalho desta tese de mestrado.

Ao Professor Doutor Virgílio do Rosário, Professor Catedrático do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Director da UEI Malária e membro do CMDT-LA, pelo rigor científico, apoio e disponibilidade que sempre demonstrou.

E a toda a equipa do CMDT, em especial às colegas Catarina Alves, Paula Figueiredo, Bianor Valente, Rute Félix e às Doutoras Fátima Nogueira e Ana Afonso pelo apoio e amizade sempre demonstrados.

Aos meus pais a quem agradeço profundamente por todos valores que me ensinaram, por despertarem o espírito científico desde muito cedo e por me apoiarem na realização de mais este objectivo.

Ao Hugo, quero agradecer a amizade, o apoio e o encorajamento nos bons e maus momentos.

À minha tia pela força demonstrada e transmitida nesta fase difícil.

Índice geral

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	III
RESUMO	IV
RESUMO	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. A MALÁRIA	2
I.2. CICLO DE VIDA DO PARASITA <i>PLASMODIUM SP</i>	4
I.3. RESISTÊNCIA A ANTIMALÁRICOS	5
I.3.1. Definição de resistência	5
I.4. FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS	7
I.4.1. Fármacos antimaláricos estudados -primaquina	8
I.4.2. Fármacos antimaláricos estudados -artemisinina	10
I.4.3. Factores que influenciam o desenvolvimento de resistência	14
I.5. METABOLIZAÇÃO DE FÁRMACOS	16
I.5.1. Farmacocinética	17
I.5.2. Farmacodinâmica	19
I.6. FAMÍLIA DE CITOCROMOS	19
I.6.1. Cyp 1A	21
I.6.2. Cyp 2B	22
I.6.3. Cyp 2C	23
I.6.4. Cyp 3A	23
I.7. GENES DE TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS	24
I.8. GENES REGULADORES DE TRANSCRIÇÃO	25
I.9. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO	27
I.10. OBJECTIVOS	29
II. MATERIAL E MÉTODOS	31
II.1. MATERIAL	32
II.1.1. Animais de laboratório	32
II.1.2. Fármacos antimaláricos	32
II.2. MÉTODOS	33
II.2.1. Extração de RNA	33
II.2.2. Síntese de cDNA	34
II.2.3. PCR em tempo real	35
II.2.3. Tratamento de dados	38
III. RESULTADOS	42
III.1. ESTUDO COMPARATIVO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO BASAL DOS GENES DAS SUB-FAMÍLIAS CYP, DOS GENES <i>MDR1A</i> E <i>1B</i> E <i>PXR</i> E <i>CAR</i>	44
III.2. ESTUDO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES, EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO AOS ANTIMALÁRICOS PRIMAQUINA E ARTEMISININA, EM 3 ESTIRPES DE <i>MUS MUSCULUS</i> , NO FÍGADO E INTESTINO	45
III.2.1. Genes codificantes de reguladores de transcrição <i>PXR</i> e <i>CAR</i>	46
III.2.2. Genes codificantes de transportadores <i>mdr1a</i> e <i>mdr1b</i>	49
III.2.3. Genes codificantes de citocromos das sub-famílias <i>CYP1A</i> , <i>2B</i> , <i>2C</i> e <i>3A</i>	51
IV. DISCUSSÃO	57
V. CONCLUSÕES	64
VI. PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	66
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
VIII. ANEXOS	82

Índice de figuras

Fig. I.1 – Ciclo de vida do parasita <i>Plasmodium spp</i> -----	4
Fig. I.2 – Classificação O.M.S. de resistência <i>in vivo</i> -----	6
Fig. I.3 – Estrutura química da primaquina-----	8
Fig. I.4 – Estrutura química da artemisinina e seus derivados -----	11
Fig. I.5 – Representação esquemática do sistema ADME -----	19
Fig. I.6 – Estrutura de Cyp P450-----	21
Fig. I.7 – Reações dependentes de de CYPs -----	21
Fig. II.1 – Representação da emissão de fluorescência pelo <i>SYBR® Green</i> -----	38
Fig. II.2 – Representação gráfica dos valores <i>Ct</i> em função log da concentração do DNA-----	40
Fig. III.1 – Padrões de expressão basal a nível hepático -----	45
Fig. III.2 – Padrões de expressão basal a nível intestinal-----	46
Fig. III.3 – Padrões de expressão de PXR no fígado (Art)-----	47
Fig. III.4 – Padrões de expressão de PXR no fígado (PQ) -----	47
Fig. III.5 – Padrões de expressão de CAR no fígado (Art)-----	47
Fig. III.6 – Padrões de expressão de CAR no fígado (PQ)-----	47
Fig. III.7 – Padrões de expressão PXR no intestino (Art)-----	48
Fig. III.8 – Padrões de expressão PXR no intestino (PQ) -----	48
Fig. III.9 – Padrões de expressão CAR no intestino (Art)-----	49
Fig. III.10 – Padrões de expressão CAR no intestino (PQ) -----	49
Fig. III.11 – Padrões de expressão de <i>mdr1a</i> no fígado (Art)-----	49
Fig. III.12 – Padrões de expressão de <i>mdr1a</i> no fígado (PQ)-----	49
Fig. III.13 – Padrões de expressão de <i>mdr1b</i> no fígado (Art)-----	50
Fig. III.14 – Padrões de expressão de <i>mdr1b</i> no fígado (PQ)-----	50
Fig. III.15 – Padrões de expressão de <i>mdr1a</i> no intestino (Art)-----	50
Fig. III.16 – Padrões de expressão de <i>mdr1a</i> no intestino (PQ) -----	50
Fig. III.17 – Padrões de expressão de <i>mdr1b</i> no intestino (Art)-----	51
Fig. III.18 – Padrões de expressão de <i>mdr1b</i> no intestino (PQ) -----	51
Fig. III.19 – Padrões de expressão de Cyp1A no fígado -----	51
Fig. III.20 – Padrões de expressão de Cyp2B no fígado-----	52
Fig. III.21 – Padrões de expressão de Cyp2C no fígado-----	52
Fig. III.22 – Padrões de expressão de Cyp3A no fígado -----	52
Fig. III.23 – Padrões de expressão de Cyp1A no intestino-----	53
Fig. III.24 – Padrões de expressão de Cyp2B no intestino -----	53
Fig. III.25 – Padrões de expressão de Cyp2C no intestino -----	53
Fig. III.26 – Padrões de expressão de Cyp3A no intestino-----	54

Índice de tabelas

Tabela I.1 – Algumas reacções de biotransformação. -----	19
Tabela I.2 – Genes-alvo dos receptores nucleares PXR e CAR -----	28
Tabela II.1 – Grupos de estudo-----	33
Tabela II.2 – Sequência de primers -----	37
Tabela II.3 – Mistura e condições de PCR em tempo real -----	38
Tabela II.4 – Média dos <i>Ct</i> e respectivos desvios-padrão-----	40
Tabela II.5 – Eficiências das reacções de amplificação do gene referência e gene-alvo-----	41
Tabela II.6 – Interpretação dos valores de <i>r</i> -----	42

Resumo

A falência terapêutica nos tratamentos antimaláricos depende de características do parasita (como a resistência por mutações no genoma do parasita) e do hospedeiro vertebrado (como a metabolização de fármacos). Este estudo teve como principal objectivo avaliar os níveis de expressão dos genes das sub-famílias Cyp1A, 2B, 2C e 3A, dos transportadores de fármacos *mdr1a* e *mdr1b* e dos reguladores de transcrição CAR e PXR, em três estirpes de *Mus musculus*: Balb/c, CD1 e Rockefeller. Os animais foram submetidos a tratamentos com primaquina e artemisinina, colhendo-se amostras de sangue, fígado e intestino 24 horas após a última dosagem. Para o estudo de expressão dos genes, seleccionou-se a metodologia de PCR em tempo real. Analisando os resultados, verificou-se uma expressão basal mais elevada de todos os genes, a nível hepático, nas estirpes Rockefeller e CD1, enquanto que no fragmento intestinal, duma maneira geral, ambas as estirpes possuem expressão das sub-famílias de citocromos mais baixa e dos transportadores de fármacos e reguladores de transcrição mais elevada que a referência (Balb/c). No estudo de expressão em resposta a antimaláricos, verificou-se que a nível hepático, após tratamento com artemisinina, ocorre expressão dos genes PXR, *mdr1b* e sub-famílias Cyp2B, 2C e 3A na estirpe CD1, *mdr1a* em Balb/c e inibição de Cyp2B em Rockefeller. No fragmento intestinal, quando submetidos ao mesmo tratamento, ocorre inibição de todos os genes estudados na estirpe Balb/c, inibição de CAR, *mdr1a* e Cyp2B, 2C e 3A em CD1 e inibição de PXR, *mdr1a*, Cyp2C e 3A e expressão de CAR e Cyp2B em Rockefeller. Quando submetidos a tratamento com primaquina ocorre expressão hepática de CAR e inibição de *mdr1a* na estirpe Balb/c e inibição de CAR em CD1. No fragmento intestinal, na estirpe Balb/c ocorre inibição dos genes *mdr1a* e da sub-família Cyp1A, em CD1 expressão de PXR e Cyp1A e em Rockefeller inibição dos reguladores de transcrição, *mdr1b* e Cyp1A e expressão de *mdr1a*. A variabilidade inter-estirpes no metabolismo de fármacos, pode contribuir para o sucesso ou falha terapêutica. Neste estudo confirmou-se a existência dessa

variabilidade podendo ser relevante na selecção de modelos murinos para estudos de fármacos, na malária.

Abstract

Therapeutic failure in malaria treatments depends on characteristics of the parasite (mutations on his genome) and vertebrate host (drug metabolic pathways). The main scope of this study was to evaluate the gene expression levels of the sub-families Cyp1A, 2B, 2C and 3A, drug transporters *mdr1a* and *mdr1b* and transcription regulators CAR and PXR, in three strains of *Mus Musculus*: Balb/c, CD1 e Rockefeller. Animals were submitted to treatments with primaquine and artemisinin, and samples of blood, liver and intestine, 24 hours after the last dosage were picked. For gene expression study the methodology selected was real-time PCR. The results show that, in the hepatic tissue, Rockefeller and CD1 strains possess higher basal expression for all genes, while in the intestine, in a general way, both strains have lower levels of Cyps sub-families expression and higher levels of drug transporters and transcription regulators. In the expression study in response to antimalarials, we observed that in the hepatic tissue, and after treatment with artemisinin, expression of PXR, *Mdr1B* genes and Cyp2B, 2C and 3A sub-families in CD1 strain, *mdr1a* in Balb/c and inhibition of the Cyp2B sub-family in Rockefeller, takes place. Under the same treatment, in the intestine, inhibition of all genes in study with Balb/c mice; inhibition of *mdr1a* and Cyp2C and 3A sub-families in CD1 and Rockefeller was observed, while inhibition of CAR and Cyp2B was only observed in CD1; further, in Rockefeller, we also observed inhibition of PXR gene and expression of CAR and Cyp2B. When submitted to treatment with primaquine, in the liver fragments, expression of CAR and inhibition of *mdr1a* in Balb/c strain and inhibition of CAR in CD1s was observed. In the intestine, under the same treatment, Balb/c shows inhibition of *mdr1a* gene and Cyp1A sub-family. In CD1 we observed expression of PXR and Cyp1A while in Rockefeller inhibition of transcription regulators, *mdr1b* and Cyp1A was seen, with expression of *mdr1a* gene.

The strain variability in the drug metabolism is one of the main factors associated to success or therapeutic failure, relevant in the choice of animal models in drug studies and in this study, the existence of such variability was confirmed.

Lista de abreviaturas

ADME – Administração, Distribuição, Metabolização e Excreção
OMS – Organização Mundial de Saúde
pfTCTP – *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein
ATP - Adenosina trifosfato
pfATPase6 – ATPaseCa²⁺ do retículo sarco/endoplasmático identificada no genoma de *Plasmodium*
Pgh1 – P-glycoprotein homologue 1
pfmdr1 – *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1
CYP – Superfamília de citocromos
DNA – Ácido desoxirribonucleico
MDR - Multidrug resistance
NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
AhR – Receptor aril-hidrocarboneto
CAR – Constitutive Androstane Receptor
PXR – Pregnane X Receptor
ABC – ATP binding cassette
AF2 – Hélice de função de activação 2
AF1 – Hélice de função de activação 1
LBD – Ligand binding domain
PQ – Primaquina
Art – Artemisinina
DMSO – Dimetilsulfóxido
CO₂ – Dióxido de carbono
RNA – Ácido Ribonucleico
cDNA – DNA complementar
DEPC – Dietilpirocarbonato
PCR – Polymerase chain reaction
RT-PCR – Reacção transversa em PCR
G – Guanina
C – Citosina
A – Adenina
T – Timina
T_m – Temperatura de *melting*
C_t – Cycle threshold
DP – Desvio Padrão
E – Eficiência das reacções de PCR
m – Declive da recta

I. Introdução

I.1. A Malária

A malária é uma das doenças mais antigas de que se tem conhecimento (Prescott *et al*, 1993; Praygod *et al.*, 2008), continuando a ser um sério problema de saúde pública, que influencia o desenvolvimento económico e social das populações atingidas. Juntamente com a tuberculose e o VIH/SIDA, representa a maior causa de mortalidade mundial entre doenças infecciosas e parasitárias, sobretudo na África subsaariana (Francesconi *et al*, 2001; Van geertruyden *et al*, 2008). A malária é uma doença causada por protozoários do género *Plasmodium* e transmitida pelo mosquito do género *Anopheles*. As espécies que infectam o Homem são o *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*, sendo esta a mais patogénica.

A distribuição da malária incide sobre as regiões tropicais e sub-tropicais, onde estão reunidas as condições para a existência e desenvolvimento do ciclo de vida do parasita e do mosquito vector. Cerca de 40% da população mundial está em risco de contrair a doença, sendo registada uma maior prevalência na África subsaariana, Sudoeste Asiático, América Latina, Médio Oriente (OMS- World Malaria Report, 2008).

De forma a tornar mais eficazes os programas de controlo da malária têm sido desenvolvidos sistemas integrados de controlo, os quais incluem as várias vertentes da infecção, nomeadamente a utilização de redes mosquiteiras, controlo dos vectores, tratamentos mais eficazes baseados em combinações de fármacos com a artemisinina (ou seus derivados) e tratamentos preventivos nos grupos considerados de maior risco (crianças e mulheres grávidas). Estes programas de controlo integrado têm sido, parcialmente, bem sucedidos, dado que, de acordo com OMS, somente em 7 de 45 países/zonas de África houve redução da morbilidade e mortalidade (OMS- World Malaria Report, 2008).

De acordo com alguns autores (I.P.C.C., 2007; MacPherson *et al.*, 2007), actualmente existe a possibilidade da malária surgir em áreas onde já foi erradicada ou está controlada, devido a alterações climáticas e ao aumento dos movimentos migratórios da população humana.

Dado os programas de controlo dependerem de fármacos, muitos dos estudos preliminares sobre estes dependem do uso de animais experimentais, tais como as estirpes de roedores aqui mencionadas, pelo que se efectuou um estudos sobre dois fármacos de mecanismo de acção distinto e estudaram-se as expressões de genes de metabolização de fármacos nesses mesmos modelos.

I.2. Ciclo de vida do parasita *Plasmodium sp*

O ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* que infectam mamíferos é semelhante (Fig.I.1), possuindo duas fases distintas:

- A) No hospedeiro invertebrado, o mosquito fêmea do género *Anopheles* inicia a sua infecção com a ingestão de gametócitos (D, Fig.I.1) durante uma refeição sanguínea, com desenvolvimento de vários estadios do parasita que, finalmente se acumulam nas glândulas salivares, onde os esporozoítos (forma infectante), durante uma nova refeição sanguínea, poderão infectar um novo hospedeiro vertebrado (A, Fig.I.1). A fase esporogónica do ciclo tem lugar no hospedeiro invertebrado e é aqui que existe uma fase sexuada, após a ingestão dos gametócitos.
- B) No hospedeiro vertebrado (fase esquizogónica), desenvolvem-se duas fases, a primeira onde ocorre multiplicação assexuada nas células hepáticas (esquizogonia exo-eritrocitária ou hepática) (B, Fig.I.1), seguindo-se o ciclo eritrocitário (esquizogonia intra-eritrocitária) (C, Fig.I.1). Esta última fase pode manter vários ciclos de invasão dos glóbulos vermelhos, e poderá eventualmente, produzir parasitas no estadio infectante para os mosquitos (gametócitos).

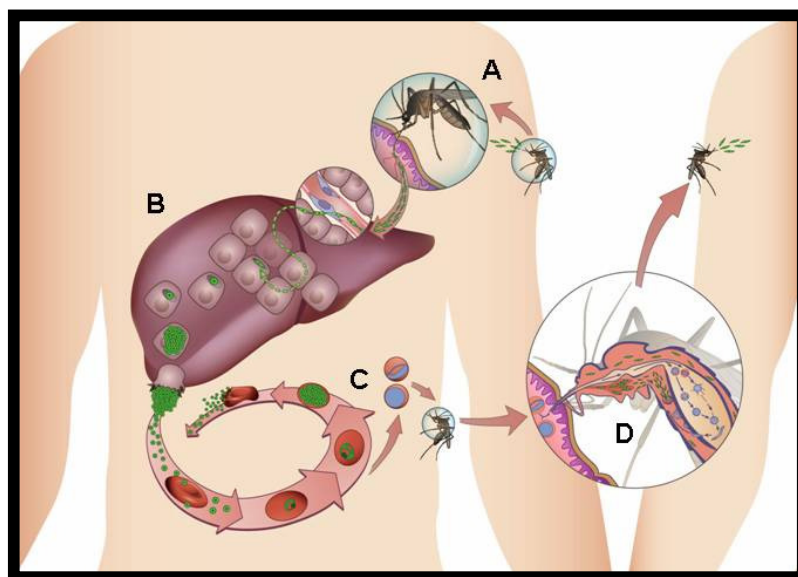


Fig. I.1 – Ciclo de vida do parasita *Plasmodium spp*
(adaptado de www.imm.ul.pt/html/uni14.html).

1.3. Resistência a antimaláricos

Do ponto de vista de saúde pública, a resistência aos antimaláricos representa um dos maiores entraves ao controlo da malária. Este fenótipo de resistência possui actualmente uma ampla distribuição no mundo (Olliaro e Taylor, 2003; Hay *et al.*, 2004), sendo responsável por um aumento da mortalidade relacionado com esta doença, principalmente em África (Hay *et al.*, 2004; White, 2004); esta distribuição varia consoante a espécie de *Plasmodium* e o tipo de fármaco antimalárico. Um diagnóstico atempado e tratamentos adequados são essenciais para uma boa estratégia de controlo da malária. No entanto, o controlo e tratamento têm sido dificultados pelo aparecimento e disseminação da resistência aos antimaláricos mais utilizados, nomeadamente à cloroquina (Hastings & D'Alessandro, 2000). A resistência surge devido a vários factores, principalmente ao uso incorrecto de antimaláricos, permitindo a selecção de parasitas resistentes, e à ausência de fármaco-vigilância adequada. Uma terapia adequada reduz não só a morbilidade e mortalidade pela malária, mas também o risco de selecção de resistência a fármacos antimaláricos (Price & Nosten, 2001).

I.3.1. Definição de resistência

De acordo com a O.M.S., pode-se definir resistência *in vivo* como “a capacidade que uma dada população de parasitas tem para se multiplicar ou sobreviver, na presença de concentrações de fármaco, que habitualmente destruiriam os parasitas da mesma espécie ou impediriam a sua multiplicação” (O.M.S., 1963). Com base nesta definição, a O.M.S. desenvolveu uma classificação de resistência *in vivo* com três níveis diferentes, baseado no período de tempo decorrido entre o desaparecimento dos parasitas após o tratamento e uma recrudescência: RI, RII, RIII (W. H. O., 1973). Em 1996, esta classificação foi modificada, de acordo com padrões clínicos, e reagrupada em:

- ETF (“Early Treatment Failure”) – Agravamento ou persistência dos sintomas clínicos com parasitemia nos três dias de pós-tratamento;

- LTF (“Late Treatment Failure”) – reaparecimento dos sintomas com parasitemia entre o quarto e décimo dia após tratamento;
- ACR (“Adequate Clinical Response”) – ausência de parasitemia ou de sintomas clínicos ao décimo quarto dia após o tratamento (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

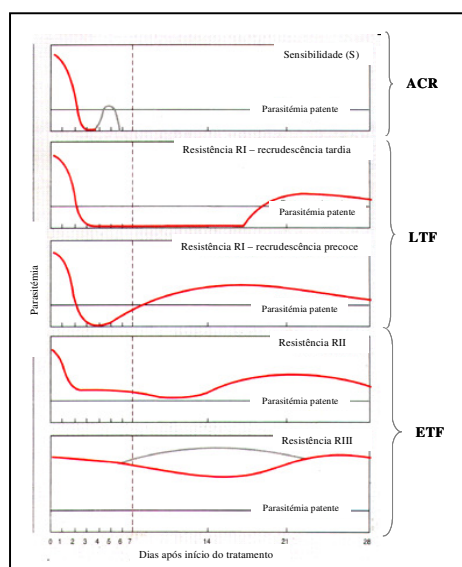


Fig. I.2 – Classificação O.M.S. de resistência *in vivo*
(adaptado de www.malariasite.com)

De relevância para o nosso estudo, considera-se que apesar de um tratamento ser correcto, pouco se sabe sobre a farmacodinâmica da terapia utilizada, que, consoante o hospedeiro, possa ter ou não uma metabolização distinta com consequências na eliminação dos parasitas.

I.3.2.1. Multi-resistência

A multi-resistência define-se como um fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos, em simultâneo ou como resistência cruzada (Le Bras & Duran, 2003).

O fenómeno de multi-resistência torna-se ainda mais grave no controlo da malária, uma vez que reduz de forma drástica o número de antimaláricos disponíveis para o tratamento da doença. Assim, é fundamental impedir o desenvolvimento de resistência, que pode ser minimizado utilizando associações terapêuticas (Ávila *et al.*, 2004). Estas têm por base o potencial cumulativo de dois ou mais

fármacos, para melhorar a eficácia terapêutica e impedir o desenvolvimento de resistência. São usados fármacos esquizotípicos, com alvos bioquímicos diferentes, e com modos de acção independentes. Recentemente, têm sido realizados vários estudos no sentido de avaliar a eficácia das novas combinações terapêuticas (Aubouy *et al.*, 2003; Awad *et al.*, 2003; Bloland, 2003; Gasasira *et al.* 2003; Gomez *et al.*, 2003; Peter, 2003; Pillai *et al.*, 2003; Schwobel *et al.*, 2003; Barrennes *et al.*, 2004; Drakeley *et al.*, 2004; Kremsner & Krishna, 2004; Molta *et al.*, 2004; Olliaro & Taylor, 2004; Sutanto *et al.*, 2004; Talisuna *et al.*, 2004; White, 2004). No entanto, como grande desvantagem da utilização das combinações terapêuticas surge o facto de estas serem muito mais dispendiosas que os fármacos antimaláricos utilizados em monoterapias, limitando a sua utilização em algumas áreas endémicas devido às dificuldades económicas. Actualmente, são recomendadas pela OMS as combinações terapêuticas baseadas na artemisinina e seus derivados de forma a aumentar a eficácia terapêutica (Depootere *et al.*, 2004; Duffy & Mutabingwa, 2004), sendo a artemisinina um dos fármacos deste estudo.

I. 4. Fármacos antimaláricos

Os primeiros tratamentos da malária realizaram-se recorrendo à utilização de plantas medicinais, isoladas a partir de *Chinchona* (o quinino) na América do Sul e de *Artemisia annua* (a artemisinina) no Extremo Oriente, como antipiréticos. Originário da América do Sul, o quinino foi trazido para Europa, sendo o único fármaco disponível para a terapia e profilaxia da malária. Durante a Primeira Grande Guerra houve dificuldades no fornecimento de quinino, o que levou à produção de antimaláricos sintéticos, com base na sua estrutura (in <http://www.rain-tree.com/quinine.htm>), surgindo, a cloroquina, amodiaquina e mepacrina.

A cloroquina durante muitos anos foi considerada um fármaco adequado a utilizações em larga escala, devido à sua baixa toxicidade, fácil administração, eficácia, facilidade de armazenamento e

acessibilidade económica (Menezes *et al.*, 2001). No entanto, este antimalárico começou, lentamente, a perder a eficácia contra o *Plasmodium falciparum*, começando a surgir focos de resistência em quase todas as zonas onde a doença é endémica. Tal facto, levou à ampla utilização de fármacos da classe dos antifolatos. A perda de eficácia de ambas as classes de fármacos levou a um aumento progressivo no uso da mefloquina nalgumas regiões e mais recentemente, da artemisinina. Neste estudo incluíram-se dois fármacos de utilização distinta no que respeita ao ciclo de vida do parasita.

I.4.1. Fármacos antimaláricos estudados: Primaquina

A primaquina é uma amino-8-quinoleína que foi desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial com o intuito de substituir alguns antimaláricos dessa classe (nomeadamente a pamaquina), mais tóxicos e menos potentes (Brooks *et al.*, 2001). A sua estrutura química é a apresentada na figura I.3.

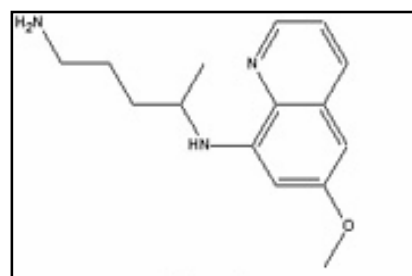


Fig. I.3 – Estrutura química da primaquina (in <http://www.psiquiatria.org.br/tratamento/imagens/interacoes.jpg>).

A primaquina possui grande valor clínico para a cura da malária recidivante, pois destrói estadios hepáticos e formas tecidulares latentes de *P.vivax* e *P.ovale* (Noel *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2008). Este antimalárico também é eficaz contra estadios hepáticos de *P. falciparum*, mas quase totalmente, ineficaz contra as formas assexuadas sanguíneas desta espécie (Baird *et al.*, 2004, Hill *et al.*, 2006), pelo que deve ser administrado em conjunto com um esquizotónico sanguíneo, que impedem a proliferação dos parasitas até forma de esquizonte, na fase intra-eritrocitária, geralmente a cloroquina (Rey, 2001; Baird *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2008). Desta forma, não é clinicamente utilizada para tratar malária por *P. falciparum*. No entanto, exerce também um efeito acentuadamente gametocida, ou seja causa a

destruição das formas sexuais intra-eritrocitárias, contra as quatro espécies de *Plasmodium* (Vale *et al*, 2008), limitando a ocorrência de transmissão (Oliver *et al*, 2008, Shekalaghe *et al* 2007).

A primaquina pode ser utilizada na profilaxia, prevenindo a parasitémia primária, pois possui elevada capacidade esquizontocida tecidular (capacidade de prevenir o desenvolvimento de esquizontes hepáticos), profilaxia terminal (prevenindo recaídas em infecções por *P. vivax* e *P. ovale* por destruição de hipnozoítos) e cura radical (usada em conjunto com um eficaz esquizonticida sanguíneo) (Hill *et al.*, 2006).

I.4.1.1. Mecanismo de acção

O mecanismo de acção deste fármaco, tal como de muitos outros antimaláricos, não está totalmente esclarecido. Julga-se que a primaquina possa actuar gerando espécies reactivas de oxigénio (o que aumenta a toxicidade intracelular) ou interferindo com o transporte de electrões no parasita (Brooks *et al.*, 2001, Hill *et al.*, 2006).

Em doses terapêuticas a primaquina é bem tolerada. No entanto, em doses mais elevadas pode causar desconforto epigástrico e abdominal. Em pessoas com deficiência de glucose-6-fosfato desidrogenase, este antimaláricos pode provocar hemólise e anemia hemolítica aguda (Brooks *et al*, 2001).

I.4.1.2. Mecanismo de resistência à primaquina

A falência terapêutica da primaquina raramente tem sido documentado, contudo, na Oceania e Ásia ocorrem fenómenos de tolerância ao fármaco pelo *P. vivax*. A escassez de registos de resistência à primaquina pode estar associada a factores químicos, físicos e/ou biológicos, como por exemplo o curto período de semi-vida do fármaco no plasma. Contudo, a resistência pode existir, mas ser difícil de detectar (Baird *et al*, 2004).

I.4.2. Fármacos antimaláricos estudados: Artemisinina

A artemisinina (ou *qinghaosu*) é o princípio activo da planta medicinal *Artemisia annua*. Esta planta tem uma longa história de utilização pelos chineses no tratamento de febres e sintomas associados à malária (Brooks *et al*, 2001; Rey, 2001; Phan, 2002). A sua ampla utilização originou estudos para o isolamento (em 1970) e síntese (em 1983) da artemisinina e seus derivados (Frédérich *et al.*, 2002), de maior tolerância para o organismo humano com eficácia no tratamento de infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* (Brooks *et al*, 2001; Phan, 2002).

Este grupo de antimaláricos causa uma redução da parasitémia aguda rápida com eficiente resposta clínica (Brooks *et al*, 2001; Hien & White, 1993). A artemisinina e seus derivados são altamente eficazes contra os estadios eritrocitários assexuados, reduzem o número de gametócitos e diminuem a infectividade dos gametócitos sobreviventes (Brooks *et al*, 2001). Não possuem capacidade hipnozoiticida, sendo pouco úteis na quimioprofilaxia e prevenção de recidivas de infecção por *P. vivax*. No caso de malária multi-resistente por *P. falciparum* devem ser associados com um fármaco de efeito prolongado (por exemplo a mefloquina), pois o seu tempo de semi-vida é muito curto (Krishna *et al*. 2004), de forma a prevenir recaídas (Brooks *et al*, 2001; Rey, 2001; Krishna *et al.*, 2004; Olliaro *et al.*, 2004; Bjorkman A *et al.*, 2005; Menard D *et al.*, 2005).

Quimicamente, pode-se caracterizar a artemisinina como uma lactona sesquiterpénica contendo uma ponte de endoperoxido, única entre os antimaláricos e essencial à sua actividade antimalárica (Brooks *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2007), diminuindo a solubilidade do fármaco. Assim, surgiu a necessidade de desenvolver vários derivados semi-sintéticos hidrossolúveis (artesunato) e lipossolúveis (artemeter e arteeter) (Fig.I.4). Todos estes derivados da artemisinina são metabolizados em dihidroartemisinina, o metabolito biologicamente activo e são hoje utilizados na terapia combinada, recomendada pela OMS.

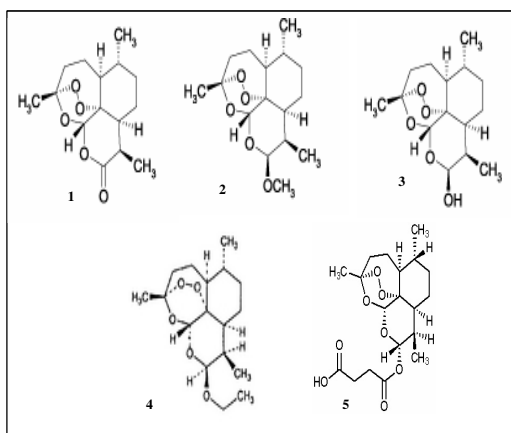


Fig. I.4 – Estrutura química da artemisinina e seus derivados (1-artemisinina, 2-artemeter, 3-dihidroartemisinina, 4-arteter, 5-artesunato) (in Delfino *et al*; www.freepatentsonline.com/6750356.html; [www.cdc.gov/.../artesunate now available.htm](http://www.cdc.gov/.../artesunate%20now%20available.htm)).

Actualmente, existe outro derivado semi-sintético em fase de ensaios clínicos, a artemisona, que parece ser o derivado mais potente (Haynes *et al.*, 2006; Vivas *et al.*, 2007). A utilização desta classe de compostos é actualmente, recomendada em combinações terapêuticas (Depoortere *et al.*, 2004; Nosten & Ashley, 2004; Olliaro & Taylor, 2004; White, 2004), constituindo a maior esperança no combate à farmaco-resistência.

I.4.2.1. Terapias Combinadas com Artemisinina

Os compostos do grupo das artemisininas, quando utilizados em monoterapia, apresentam elevadas taxas de recrudescência, pois possuem tempos de semi-vida curtos (3-5 horas), sendo necessários tratamentos com mais de 5 dias para se obter eliminação total da parasitémia (Robert *et al.*, 2001). No entanto, em combinação com outros fármacos constituem, actualmente, a maior esperança no tratamento da malária. As combinações, baseadas na artemisinina e derivados, são particularmente efectivas e de actuação muito rápida (Gomez *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003; Adjuik *et al.*, 2004; Barennes *et al.*, 2004; Drakeley *et al.*, 2004; White, 2004), além de que apresentam a capacidade de sinergir com a maioria dos antimaláricos (Gupta *et al.*, 2002a, b). A combinação de artemisinina, ou um dos seus derivados, com outro fármaco é denominada Terapia Combinada com Artemisinina

(ACT's). Este tipo de terapia é actualmente recomendada pela O.M.S. como tratamento de primeira linha para a infecção por *P. falciparum* (WHO guidelines for the treatment of malaria, 2006). As combinações terapêuticas apresentam como vantagens: a) reduzir a recrudescência e o risco de selecção de parasitas resistentes, b) diminuir o tempo de tratamento, c) aumentar a eficácia dos fármacos (in <http://www.malariasite.com/MALARIA>). Tal facto é conseguido, pois os fármacos antimaláricos utilizados possuem diferentes mecanismos de acção. Diversas combinações baseadas na artemisinina e seus derivados foram desenvolvidas, incluindo Coartem®, que resulta da combinação de artemeter e lumefantrina, e a combinação de artesunato e amodiaquina, mefloquina, ou sulfadoxina-pirimetamina (Balint GA 2001; Olliaro PL *et al.* 2004; Burk O *et al.* 2005; Campbell P *et al.* 2006; WHO guidelines for the treatment of malaria, 2006).

I.4.2.2. Mecanismo de acção

O mecanismo de acção deste grupo de antimaláricos ainda não é totalmente conhecido, no entanto, tem sido atribuído à sua capacidade de gerar radicais livres devido à ponte de endoperóxido presente em todas as moléculas de artemisina e derivados (Robert *et al.*, 2001). Estudos sobre o mecanismo de acção deste fármaco estão revistos por Meshnick, 2002.

Actualmente, existem dois mecanismos moleculares propostos para explicar o modo de acção da artemisinina e seus derivados, baseados nos genes *pfTCTP* (*P. falciparum* TCTP - “translationally controlled tumor protein”) e *pfATPase6* [única ATPaseCa²⁺ do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) identificada no genoma do *Plasmodium*] mas estes resultados requerem confirmação através de estudos com *P. falciparum* resistente ao medicamento.

Resultados de experiências realizadas para avaliar a actividade *in vitro* destes compostos em *P. falciparum*, noutros protozoários e em linhas celulares eucariotas sugerem que o seu mecanismo de acção é específico para o *P. falciparum* (Golenser *et al.*, 2006). A artemisinina e seus derivados são

fármacos com efeitos adversos pouco importantes, como prurido, náuseas e febre (Brooks *et al.*, 2001; Rey, 2001).

I.4.2.3. Mecanismo de resistência à artemisinina e seus derivados

Até muito recentemente, a artemisinina e derivados eram eficazes não existindo relatos de resistência às referidas combinações, tendo sido reportados apenas alguns casos de diminuição de susceptibilidade. No entanto, as ACT's têm vindo a perder a sua eficácia, tendo sido reportados alguns casos no final de 2008, na Tailândia e no Camboja (Noedl *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008).

O mecanismo através do qual os parasitas do género *Plasmodium* apresentam a capacidade de tolerar a presença desta classe de fármacos, tal como acontece com a maioria dos antimaláricos em utilização, ainda não se encontra esclarecido. No entanto, considera-se que mutações na proteína Pgh-1 (produto do gene *pfmdr1*) possam influenciar o nível de susceptibilidade à artemisinina (Duraisingh *et al.*, 2000 a, b; Reed *et al.*, 2000), à semelhança do que se verifica com a mefloquina e halofantrina. O fenómeno de resistência à artemisinina, ou seus derivados, poderá voltar a ser induzido *in vitro*, tal como já foi realizado por Inselburg (1985) e ou em modelos roedores (Hunt *et al.*, 2006) e como aconteceu com outros fármacos, tendo já começado a surgir, muito recentemente, em áreas endémicas sendo ainda muito restrito, limitando-se essencialmente ao sudoeste asiático.

A não comprovação da resistência clínica à artemisinina pode estar associada a três factores: a utilização dos derivados de artemisinina em combinação com outros fármacos, cuja acção conjunta retarda o surgimento de parasitas resistentes; a actividade gametocítica dos compostos, inibindo a transmissão de eventuais estirpes resistentes; o tempo de semi-vida curto (Ittarat *et al.*, 2003) embora este requeira investigação, do tipo da que é apresentada neste trabalho.

I.4.3. Factores que influenciam o desenvolvimento de resistência

O fenómeno de resistência dos parasitas aos antimaláricos tem sido objecto de diversos estudos, que se baseiam essencialmente nas características do parasita, com uma incidência especial na identificação de genes de *Plasmodium falciparum* e respectivos polimorfismos de sequência ou expressão, que permitam ao parasita adquirir a capacidade de se adaptar a um ambiente adverso (neste caso presença de fármaco). Estes estudos pretendem efectuar a associação entre os genes/polimorfismos e a susceptibilidade a determinado antimalárico, e avaliação do seu potencial como marcadores moleculares de resistência. No entanto este fenómeno de resistência parece ser bastante mais complexo, resultando de diversos factores, tais como:

- Características do hospedeiro humano
 1. Imunidade: por vezes, mesmo após o tratamento, o sistema imunitário tem de eliminar uma parasitémia residual. Contudo, quando o sistema imunitário não é tão eficaz, ficam alguns parasitas que não são eliminados, promovendo a selecção de parasitas resistentes (Djimde *et al.*, 2003, White, 2004);
 2. Farmacogenética e farmacocinética: os antimaláricos são metabolizados por enzimas da super família dos citocromos P450 (CYPs), entre eles os CYP2C19, CYP2C8, CYP3A4 e CYP3A5 (Gião & de Vries, 2001). A metabolização dos antimaláricos apresenta variações entre indivíduos, devido ao facto dos genes que codificam os CYPs serem polimórficos, originando enzimas com capacidades catalíticas diferentes, que por sua vez resultam em cinéticas de metabolização diferentes. Por exemplo, uma metabolização mais rápida do fármaco, contribui para uma exposição do parasita a doses sub-terapêuticas (Vennerstrom *et al.*, 2000). Em que os níveis de fármaco no sangue, com uma concentração deficiente para realizar uma protecção terapêutica, podem permitir

uma pressão selectiva favorável aos parasitas, seleccionando os mais resistentes (White, 2004). O nosso estudo teve por objectivo este tema.

- Características associadas à selecção de parasitas resistentes:
 1. Marcadores moleculares de resistência: existem para quase todos os antimaláricos, marcadores moleculares parasitários associados a resistência destes, sobretudo no modelo murino e em *P. falciparum*. Estes marcadores têm sido utilizados em estudos de epidemiologia molecular, resistência aos fármacos e mesmo para estudos de avaliação do sucesso terapêutico na clínica (Trotta *et al.*, 2004).
- Características do fármaco antimalárico:
 1. Dosagem: existem três factores que podem estar associados à dosagem do antimalárico, sendo eles a administração sucessiva de doses sub-terapêuticas, a administração indevida de antimaláricos para o tratamento de outras patologias (Payne, 1988; Wernsdorfer, 1991; 1994) e a qualidade do fármaco (uma vez que no processo de manuseamento, processamento e armazenamento pode ocorrer a deterioração do mesmo e consequente diminuição da concentração do respectivo princípio activo) (Ballereau *et al.*, 1997; Shakoor *et al.*, 1997).
 2. Resistência cruzada: existem antimaláricos que possuem semelhanças químicas, podendo a resistência a um deles facilitar o desenvolvimento de resistência a outro relacionado (Hall *et al.*, 1975; Basco *et al.*, 1991). Esta característica também está associada ao próprio parasita dado que um gene ou sua mutação pode afectar mais que um fármaco.
 3. Combinações incorrectas de fármacos: os tempos de semi-vida de cada fármaco são de extrema importância, sobretudo nas combinações terapêuticas (Watkins *et al.*, 1993).

1.5. Metabolização de fármacos

O metabolismo de fármacos apresenta diferenças entre raças e/ou estirpes e mesmo inter-individuais que podem ser explicadas por factores diversos, tais como a patofisiologia, fisiologia, dieta do indivíduo e por factores genéticos. Toda a metabolização de fármacos inclui uma actividade hepática, da responsabilidade de enzimas específicas. Os polimorfismos genéticos (variações alélicas do mesmo gene) são extremamente comuns nestas enzimas metabolizadoras, originando uma grande variabilidade inter-individual no metabolismo de fármacos, resultando em efeitos adversos e níveis séricos diferentes. O conhecimento da capacidade metabólica numa população e o ajuste de doses terapêuticas em indivíduos com determinados genótipos, contribui para a diminuição do risco de falha terapêutica ou de efeitos adversos do fármaco. A caracterização do genoma humano permitiu avanços no conhecimento de variabilidade genética, no que respeita à metabolização de fármacos (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001).

Desde 1950 que a variabilidade existente nos efeitos dos fármacos tem sido estudada (Evans & McLeod, 2003), tendo as primeiras observações sido efectuadas ainda no período da II Guerra Mundial, quando a ingestão de primaquina como antimalárico resultou em casos de hemólise. Mais tarde verificou-se que esta advinha duma deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (Gilman, 2003).

A resposta a um fármaco, como já foi referido, está dependente de diversos factores cujos efeitos podem ser sinérgicos ou inibitórios (Gilman, 2003).

Uma substância pode provocar uma alteração no efeito dum fármaco, influenciando a sua farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), a sua farmacodinâmica (efeito do fármaco no organismo) ou ambas. Desta forma, para melhor compreender os processos que se seguem à administração dum fármaco, torna-se importante compreender os fenómenos de farmacocinética e de farmacodinâmica do mesmo.

I.5.1. Fármacocinética

Compostos endógenos ou exógenos podem interferir com o processo farmacocinético de um fármaco específico. A nível clínico, as interacções mais importantes são as que envolvem a absorção e metabolismo do fármaco (Gilman, 2003).

Os fármacos podem ser administrados por vias diversas, sendo posteriormente absorvidos para a corrente sanguínea. O principal local de **absorção** é o trato gastrointestinal, pois grande parte dos fármacos é administrada por via oral. O processo de absorção, na sua maioria, ocorre por difusão passiva sem gastos energéticos, mas podem estar envolvidos transportadores, havendo aqui dispêndio de energia. Uma vez em circulação, o fármaco é distribuído para diferentes locais do organismo (por exemplo tecido adiposo, fluído intersticial) donde será posteriormente eliminado. A **distribuição** é um fenómeno reversível que sofre influência da solubilidade lipídica, concentração plasmática e tecidual do fármaco e sua ligação a proteínas plasmáticas e transportadores. Para se tornarem activos, muitos fármacos necessitam de ser metabolizados. A **metabolização** ocorre no fígado, correspondendo à biotransformação do fármaco com o objectivo de reduzir a sua solubilidade lipídica e torná-lo num metabolito excretável. Este processo ocorre em duas fases: as reacções de Fase I e Fase II. As reacções de Fase I constituem, na sua maioria, processos de destoxificação em que há a inserção dum grupo funcional, por exemplo: -OH, -NH₂, -SH, criando produtos mais reactivos. Entre as enzimas de fase I, destacam-se os Citocromos P450. Nas reacções de Fase II, também denominadas de reacções de conjugação, o fármaco, ou o seu metabolito, é conjugado a substâncias endógenas hidrofílicas (como ácido glucurónico, sulfato e grupos metil) para ser eliminado. Nestas reacções estão envolvidas diversas enzimas como sulfotransferases, catecol-o-metiltransferases, entre outras.

Tipo de reacção	
Fase I	Oxidação alifática Oxidação aromática N-oxidação S-oxidação Desaminação N-dealquilação O-dealquilação
Fase II	Conjugação

Tabela I.1. – Algumas reacções de biotransformação.

Por vezes, os fármacos possuem na sua estrutura grupos funcionais, não sofrendo reacções de fase I, mas apenas as de conjugação de fase II. Para além das enzimas metabolizadoras de fase I e II existem outras proteínas envolvidas neste processo, associadas ao transporte de fármacos ou seus metabolitos. Estas proteínas são identificadas em tecidos com funções de excreção ou protecção, sendo as mais estudadas as *multidrug resistance (MDR) proteins*. Os fármacos podem ser eliminados na sua forma inalterada ou sob a forma de metabolitos. A **excreção**, usualmente, ocorre pela urina e pode ocorrer reabsorção intestinal de fármacos que são secretados para a bilis.

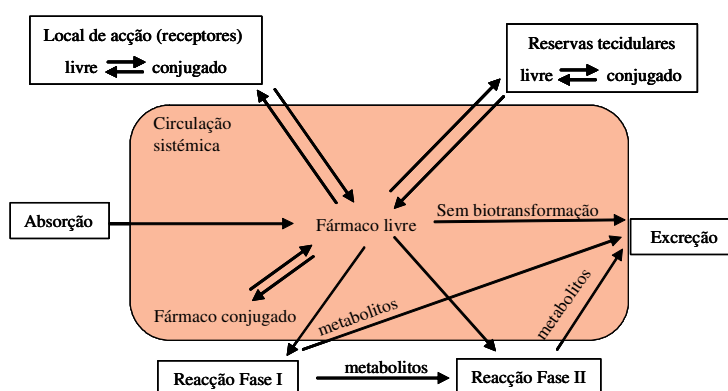


Fig. I.5 – Representação esquemática do sistema Absorção-Distribuição-Metabolização-Excreção

I.5.2. Farmacodinâmica

A farmacodinâmica descreve o efeito que um fármaco, ou seu metabolito, tem no organismo, aquando da sua ligação ao receptor correspondente. O efeito farmacológico pode ser influenciado por diferentes factores, tais como: a dose de fármaco, a farmacocinética, o número de receptores livres ou a competição com outros fármacos pelos receptores e factores genéticos (Perazella & Parikh, 2005).

I.6. Família de citocromos

Ao longo dos tempos os seres vivos foram evoluindo e necessitando cada vez mais de mecanismos que os protegessem contra produtos tóxicos. Um destes mecanismos é o sistema P450, que metaboliza uma grande diversidade de substratos e está portanto fortemente associado à farmacocinética. O nome desta superfamília deriva da sua absorção ocorrer numa banda de 450 nm. O sistema P450 corresponde a uma das maiores superfamílias de proteínas, constituída por 107 membros, cujos genes se encontram em todos os organismos (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

A superfamília de genes P450 é classificada com base em critérios filogenéticos, organização de genes e constituição de aminoácidos. Assim, a sigla *CYP* é seguida de um número representativo da família (correspondendo a proteínas que partilham mais de 40% da sequência de aminoácidos – Cyp1, Cyp2, Cyp3), uma letra para sub-famílias (Cyp1A, Cyp2B, Cyp3A) e um número para o gene, temos como exemplo Cyp2C19 (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Gúzman & Carmona-Fonseca, 2006; Woodland *et al.*, 2008).

As proteínas P450 encontram-se envolvidas nas reacções de fase I do metabolismo de fármacos (Woodland *et al.*, 2008). Assim, possuem localização maioritariamente hepática, contribuindo para a metabolização de xenobióticos (Woodland *et al.*, 2008), mas também podem possuir localização extra-hepática (Marini *et al.*, 2007; Kawase *et al.*, 2008). Variações na actividade de uma, ou mais enzimas

deste complexo podem fazer com que o fármaco não passe à sua forma activa, ou que possua uma conversão tão rápida que ocorra logo a sua excreção (Gúzman & Carmona-Fonseca, 2006). Existem diversos factores que podem provocar a inibição da actividade das CYPs, como por exemplo, o consumo simultâneo de outros medicamentos metabolizados pela mesma via e a intervenção de monóxido de carbono nos mecanismos de oxidação. Este possui elevada afinidade à enzima, prevenindo a ligação e activação do oxigénio, e consequentemente, inibindo a sua actividade.

Na sua constituição, cada enzima possui: um centro activo para a catalização (o grupo proteico de ferro), uma cadeia polipeptídica codificada por um só gene, uma enzima flavoproteínica dependente de NADPH e um citocromo relacionado com o transporte de electrões no sistema oxidativo (Gúzman & Carmona-Fonseca, 2006).

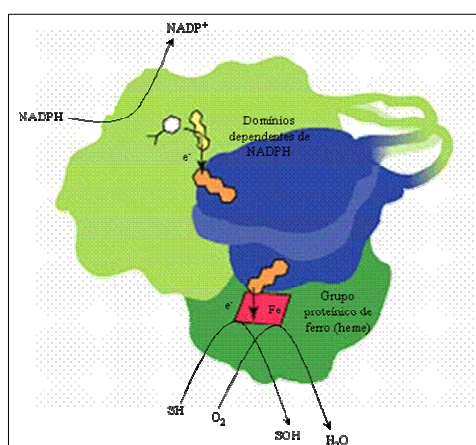


Fig. I.6 – Estrutura de Cyp P450

(adaptado de <http://www.mib.ac.uk/images/Staff/leys3.jpg>).

As reacções de fase I envolvendo as enzimas CYPs baseiam-se em reacções de oxidação dos substratos (Martignoni *et al.*, 2006). Para que essa oxidação ocorra, as CYPs, denominadas mono-oxigenases, usam electrões da molécula NADPH para catalizar a activação da molécula de oxigénio, oxidando os substratos. Assim, as enzimas CYP catalizam a inserção de um átomo de oxigénio no substrato, sendo o segundo átomo de oxigénio reduzido a água. (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

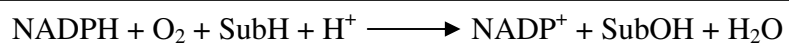


Fig. I.7 – Reações dependentes de CYPs (Sub=substrato)
(adaptado de Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

A sequência catalítica envolve quatro etapas: ligação ao substrato; redução do complexo enzima-substrato; ligação ao oxigénio, formando um complexo superóxido; uma segunda redução, originando as espécies de oxigénio activa. Após esta sequência, o xenobiótico sofre os mecanismos seguintes da metabolização dos fármacos.

Para além da sua participação na metabolização de fármacos, as enzimas CYP são responsáveis por outros mecanismos fisiológicos como a biossíntese e catabolismo de moléculas de sinalização, hormonas esteróides, na oxigenação de ácidos gordos, entre outras (Pascussi *et al.*, 2003). Uma vez que possuem diversas funções, as CYP não se encontram exclusivamente num órgão, no entanto, como já foi referido, encontram-se em abundância no fígado (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Algumas das enzimas CYPs encontram-se na membrana interna das mitocôndrias. Contudo, a grande maioria encontra-se ancorada na face externa do retículo endoplasmático, tal como as redutases NADPH.

I.6.1. Cyp 1A

A subfamília Cyp1A engloba duas proteínas Cyp1A1 e Cyp1A2 (Kondraganti *et al.*, 2002), estando os seus genes localizados no cromossoma 15 (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>), a uma distância de 23 kilobases (Corchero *et al.*, 2001). Os seus mecanismos de regulação da transcrição são diferentes e, consequentemente, também o são os seus padrões de expressão (Jaruchotikamol *et al.*, 2007). Após indução do tratamento, ambos os genes são expressos nas células do tecido hepático, mas apenas o Cyp1A2 possui expressão basal. Por sua vez, o Cyp1A1 possui expressão extra-hepática (Iwanari *et al.*, 2002; Choudhary *et al.*, 2005; Jaruchotikamol *et al.*, 2007). O receptor aril-hidrocarboneto (AhR) desempenha um papel importante na regulação e indução da expressão desta

subfamília (Shimada *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2005; Jaruchotikamol *et al.*, 2007). O receptor AhR heterodimeriza com o translocador nuclear aril-hidrocarboneto e activa a transcrição de genes-alvo, como o Cyp1A, na resposta a xenobióticos (Liu *et al.*, 2008). Shimada e seus colaboradores (2002) demonstraram o envolvimento do receptor AhR, administrando carcinogénicos a ratos que não expressam esse receptor. Esses ratos resistiam à tumorigénese, provavelmente reflectindo a sua incapacidade de expressarem níveis significativos de Cyp1A1 (que participam na biotransformação dos xenobióticos administrados).

I.6.2. Cyp 2B

Tal como as restantes enzimas citocromos, a subfamília CYP2B metaboliza uma grande variedade de xenobióticos e substâncias endógenas, com estruturas químicas bastante divergentes (Yamada *et al.*, 2000), localizando-se no cromossoma 19 (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>). Esta subfamília possui algumas particularidades, tornando interessante o seu estudo: diferenças de expressão entre etnias, identificação de novos substratos e possível partilha da especificidade e regulação da activação transcricional com outra subfamília, a CYP3A (Pascussi *et al.*, 2003).

O mecanismo pelo qual a expressão da subfamília CYP2B é induzida não é completamente conhecido, mas sabe-se que o receptor nuclear CAR desempenha um papel crucial na regulação desta subfamília CYP2B (Marini *et al.*, 2007). Aquando da presença do xenobiótico, o receptor CAR é recrutado do citoplasma para o núcleo. Uma vez no núcleo, o receptor nuclear forma um heterodímero e interage com a região 5' da subfamília CYP2B (Yamada *et al.*, 2000).

I.6.3. Cyp 2C

A subfamília de genes CYP2C expressa-se, principalmente, no fígado, representando cerca de 7% do conteúdo de CYP microsomal (Klose *et al.*, 1999) e localiza-se no cromossoma 10 (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>). Esta subfamília está envolvida no metabolismo de numerosos substratos (Pascussi *et al.*, 2003), entre eles alguns fármacos antimaláricos como a amodiaquina e cloroquina (Li *et al.*, 2002; Projean *et al.*, 2003). O facto de possuir numerosos substratos pode ser devido às dimensões elevadas do seu sítio activo (Schoch *et al.*, 2004). Para além dos seus substratos exógenos, alguns membros da subfamília CYP2C desempenham funções endógenas, tendo sido descrito o seu envolvimento na biossíntese de factores vaso-reguladores (Dai *et al.*, 2001; Goldstein, 2001). Contudo, o mecanismo pelo qual a expressão da subfamília CYP2C é regulada não é totalmente conhecido, pensando-se que envolva os receptores CAR e PXR, à semelhança da subfamília CYP3A (Raucy *et al.*, 2002).

I.6.4. Cyp 3A

A subfamília CYP3A é de maior importância no metabolismo de numerosos xenobióticos, sendo a mais abundante das monooxigenases, em mamíferos (representa cerca de 40% do total conhecido), metabolizando grande parte dos fármacos (cerca de 50%) (Galetin, *et al.*, 2005; Gúzman & Carmona-Fonseca, 2006; Lamba *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2006). Os genes codificantes das enzimas desta subfamília encontram-se no cromossoma 7 (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html>), possuindo localização hepática e sendo, também, um importante metabolizador na parede intestinal (Krusekopf *et al.*, 2003; Woodland *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2006). A sua elevada capacidade de reconhecer diferentes substratos pode estar associada ao facto do local de ligação ao substrato acomodar moléculas de dimensões variadas. Existem diferenças significativas de expressão

de CYP3A entre espécies, de acordo com sexo, tecido e idade (Woodland *et al.*, 2008), que podem ser devido a: mecanismos de controlo homeostáticos, estímulos ambientais e mutações genéticas (Lamba *et al.*, 2002).

As diferenças de expressão encontradas dificultaram o desenvolvimento de métodos que identificassem os compostos que modulam a transcrição de CYP3A (Jones *et al* 2000). No entanto, actualmente, sabe-se que a indução da expressão de Cyp3A4 é regulada pelo receptor nuclear PXR (Krusekopf *et al.*, 2003; Marini *et al.*, 2007; Woodland *et al.*, 2008). Martignoni e colaboradores (2006) demonstraram a capacidade do fármaco induzir a transcrição do CYP3A, em ligação directa ao PXR. A distribuição do gene PXR é semelhante à do gene *CYP3A*, sendo predominantemente hepática, o que leva a crer que seja importante na indução e expressão constitutiva deste gene. O PXR, uma vez activado, liga-se aos elementos de resposta a xenobióticos na zona do promotor do CYP3A, activando a sua expressão (Lecluyse, 2001).

1.7. Genes de transportadores de fármacos

Os transportadores de fármacos, na sua maioria, pertencem à superfamília de proteínas membranares denominada *ATP-binding cassette (ABC)*, influenciando a concentração intracelular de diversos compostos. Os transportadores de efluxo actuam como barreiras, prevenindo a absorção de compostos exógenos. No entanto, quando se localizam no fígado ou no rim, podem contribuir para a excreção do fármaco (Szakács *et al.*, 2006). O transporte do fármaco ocorre de forma activa, estando dependente de ATP; contudo, por vezes, pode ocorrer a favor do gradiente de concentração, não havendo dispêndio de energia.

O primeiro membro desta superfamília a ser descoberto foi a glicoproteína-P em 1976, sendo ainda amplamente estudada (Juliano & Ling, 1976; Couture *et al.*, 2006). A glicoproteína-P (P-gp) é

codificada pelo gene de *multidrug resistance* (MDR1 nos humanos e *mdr1a* e *mdr1b* nos roedores) e assume-se que possua um mecanismo protector contra xenobióticos, potencialmente tóxicos. Existem diversos fármacos antimaláricos que interagem com a glicoproteína-P, sendo substratos fracos do transportador (Pham *et al.*, 2000; Crowe *et al.*, 2006), ou mesmo inibindo-o (Hayeshi *et al.*, 2006). Assim, podemos afirmar que a P-gp actua como uma barreira intestinal que influencia o início do metabolismo dos fármacos, por prolongar o tempo de acesso dos mesmos ao intestino (Murakami *et al.*, 2008) e no fígado facilita o efluxo dos xenobióticos da célula para a bilis (Takano *et al.*, 2006). Polimorfismos nos genes que codificam para os transportadores são muito comuns, alterando a função e expressão da glicoproteína-P.

1.8. Genes reguladores de transcrição

Os receptores nucleares representam uma classe de factores de transcrição que têm como função regular diversos processos celulares (Krasowsky *et al.*, 2005; Alarid, 2006). Desta forma, os receptores nucleares desempenham um papel importante na protecção do organismo contra compostos xenobióticos tóxicos. Os receptores nucleares possuem uma estrutura de domínios muito semelhante, com um domínio N-terminal altamente variável, um domínio central conservado (*DNA Binding Domain*-DBD) e um domínio C-terminal de ligação (*Ligand Binding Domain*-LBD). Este último domínio possui cerca de 250 aminoácidos e duas propriedades muito importantes: uma região hidrofóbica e uma hélice de função de activação-2 (AF-2) na extremidade de C-terminal. A região hidrofóbica constitui o local de ligação dos compostos e a hélice AF-2 permite a ligação de co-activadores; a hélice sofre alterações conformacionais, durante o processo de ligação, permitindo ao receptor interagir com co-activadores e activar a transcrição. O domínio N-terminal é extremamente variável em tamanho e sequência de aminoácidos e, em alguns receptores nucleares, possui uma

segunda função de activação da transcrição denominada AF-1 (Kliewer *et al.*, 2002; Krasowsky *et al.*, 2005).

O *Pregnane X receptor (PXR)* pertence à família de receptores nucleares, tendo sido identificado como um regulador de transcrição de numerosas proteínas envolvidas no metabolismo e excreção de substâncias lipofílicas. Essas proteínas podem estar envolvidas em reacções de oxidação (enzimas de fase I, como citocromos), reacções de conjugação (enzimas de fase II), ou em reacções de transporte no fígado e no intestino estimulam a expressão de transportadores de membrana, como a glicoproteína-P (Kliewer *et al.*, 2002; Maglich *et al.*, 2002; Tirona & Kim, 2005). Para que haja a indução da expressão de outros genes, é necessária a estimulação do *PXR*. Essa estimulação ocorre por ligação dos compostos indutores ao domínio *LBD*, promovendo a ligação de um co-activador. Quando o heterodímero se encontra formado, liga-se ao promotor do gene alvo induzindo a sua expressão (Harmsen *et al.*, 2007). Este receptor possui elevada expressão no fígado e intestino, quer no humano quer no roedor (Jones *et al.*, 2000; Kliewer *et al.*, 2002; Krasowsky *et al.*, 2005) e seus locais de expressão correspondem aos mesmos locais da família dos citocromos 3A (Cyp3A). Assim, pensa-se que a expressão de *PXR* regule a expressão de Cyp3A (Jones *et al.*, 2000; Kliewer *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002; Chirulli *et al.*, 2004). Esta teoria é corroborada também pelo facto do *PXR* ser eficientemente activado pelos indutores de expressão do Cyp3A. Este receptor nuclear possui baixa especificidade, aceitando uma grande variedade de ligandos, como por exemplo, diversos xenobióticos ou, mesmo, substâncias endógenas como ácidos da bilis (Jones *et al.*, 2000; Kliewer *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002; Krasowsky *et al.*, 2005; Ekins, *et al.*, 2008).

O *Constitutive Androstane Receptor (CAR)* é o receptor nuclear que mais se aproxima do *PXR*, funcionando como uma xenosensor (Moore *et al.*, 2002). Este receptor é activado pelos mesmos ligandos que o *PXR*, regula a expressão de alguns genes comuns (como genes das subfamílias Cyp3A, Cyp2B e transportadores), é expresso no fígado e intestino, actua sob a forma de heterodímero e

apresenta diferenças nos perfis de activação entre espécies (Ueda *et al.*, 2001; Maglich *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002; Maglich *et al.*, 2003; Kanno *et al.*, 2004; Harmsen *et al.*, 2007). No entanto, estudos demonstraram que possuem diferenças significativas entre eles. Assim, o CAR foi caracterizado como sendo mais selectivo nas suas interacções, devido ao facto do seu local de ligação de compostos ser de menores dimensões, e por possuir um nível de actividade basal mais elevado (Kliewer *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002) que o PXR. Outra diferença entre os receptores consiste no facto do CAR ser citoplasmático no estado inactivo, sendo incapaz de activar a transcrição de genes (Harmsen *et al.*, 2007) e, somente, quando ocorre a desfosforilação do receptor, é efectuado o seu transporte até ao núcleo (Moore *et al.*, 2002). Contudo este mecanismo ainda não se encontra totalmente esclarecido (Harmsen *et al.*, 2007).

Receptor Nuclear	Genes-alvo
PXR	cyp2B6, cyp2C8, cyp2C9, cyp2C19, cyp3A4, enzimas de faseII, MDR1
CAR	cyp2B6, cyp2C9, cyp2C19, cyp3A4, enzimas de faseII

Tabela I.2 – Genes-alvo dos receptores nucleares PXR e CAR, em Humanos (Harmsen *et al.*, 2007)

I.9. Justificação do estudo

São identificadas numerosas mutações que justificam, no *Plasmodium falciparum* e mesmo em outros modelos experimentais (*P. chabaudi* em roedor), o fenómeno de falência terapêutica. (Lim *et al.*, 2009), contudo, esta não parece depender exclusivamente de factores intrínsecos ao parasita, sendo um fenómeno complexo, resultando de um conjunto de factores que envolvem características do hospedeiro humano, nomeadamente associados à metabolização e transporte dos próprios fármacos. O fracasso terapêutico e a resistência a antimaláricos são hoje o maior problema nos programas de controlo da malária em países endémicos. Pouco se sabe sobre a contribuição do hospedeiro para esse

processo, embora seja conhecida uma grande variabilidade inter-individual no metabolismo de fármacos, com consequências por vezes importantes para o sucesso ou falha terapêutica, em outras classes de fármacos. A variação inter-individual na resposta a fármacos deve-se maioritariamente a polimorfismos genéticos ou à indução/inibição do metabolismo ou transporte desses fármacos. Estes polimorfismos podem ocorrer nos genes que codificam para diversos enzimas e transportadores, conduzindo a variações da actividade, dos níveis de expressão, e nalguns casos, à total ausência de proteína como referido na introdução anterior.

A existência destes polimorfismos genéticos dá origem à formação de subgrupos distintos com diferentes capacidades metabólicas relativamente a um substrato específico. Assim, os metabolizadores lentos ou pobres (*poor metabolizers*, PMs) poderão acumular níveis plasmáticos superiores ao esperado, podendo ocorrer efeitos secundários adversos. Se um pró-fármaco for administrado a um PM, este poderá estar em risco de falha terapêutica, uma vez que este composto necessita de metabolização para originar o composto activo. Por outro lado, um metabolizador rápido ou extensivo (*extensive metabolizer*, EM) poderá apresentar níveis mais baixos de fármaco (sub-terapêuticos) a partir de uma dosagem standard.

A capacidade metabólica individual relativamente a um determinado substrato pode depender também de variações na concentração destas proteínas. Os níveis de expressão destas proteínas podem variar em função de diversos factores, entre eles a exposição aos próprios fármacos. É frequente um fármaco induzir a expressão das enzimas que o metabolizam. Essa variação reflecte, na maior parte dos casos, uma alteração na taxa de transcrição dos genes correspondentes (Ribeiro and Cavaco, 2006).

As enzimas CYP450 desempenham um papel fundamental no metabolismo duma série de compostos, incluindo fármacos. A indução de enzimas CYPs por um fármaco pode potenciar o metabolismo de outros co-administrados que sejam substrato dessa mesma enzima. Uma vez que o papel do complexo enzimático P450 na resposta terapêutica antimalárica ainda não está totalmente esclarecido (Gúzman & Carmona-Fonseca, 2006), torna-se importante conhecer o do metabolismo de drogas anti-parasitárias,

de forma a otimizar a sua dosagem, aumentando a eficácia terapêutica (Li *et al.*, 2003). Desta forma pretendeu-se verificar quais as enzimas CYP450 cuja expressão é influenciada pela primaquina e artemisinina, dois antimaláricos de uso global (em fases do ciclo parasitário distinto), no mamífero.

Alguns factores de transcrição foram já caracterizados, entre os quais o PXR (*pregnane X receptor*), que apresenta a capacidade de reconhecer e mediar o efeito de uma série de fármacos e outros xenobióticos na expressão genética, regulando de forma coordenada a expressão de enzimas e transportadores. Dado que também estes factores de transcrição apresentam polimorfismos, um nível adicional de variabilidade pode ocorrer, ainda pouco estudado, sobretudo no seu potencial papel na eficácia terapêutica de antimaláricos.

Os principais estudos efectuados centram-se no parasita, menosprezando os factores do hospedeiro que possam influenciar a resposta terapêutica (Gúzman & Carmona-Fonseca, 2006). Um estudo dos padrões de expressão das moléculas envolvidas na metabolização, transporte de fármacos e na regulação dos mesmos, utilizando modelos roedores, contribuirá para esclarecer os mecanismos associados à falência terapêutica e pode ajudar um investigador a melhor seleccionar um modelo de laboratório, de malária em roedor, de acordo com os objectivos da investigação científica.

1.10. Objectivos

O presente trabalho pretende contribuir para o aumento do conhecimento sobre metabolismo de fármacos antimaláricos, em 3 estirpes de murganhos, não infectados, tratados com 2 fármacos antimaláricos, tendo como objectivos:

- Estudo comparativo dos níveis de expressão basal dos genes codificantes dos reguladores de transcrição CAR e PXR, dos genes transportadores de fármacos *mdr1a* e *mdr1b*, e dos genes das sub-famílias CYP nas estirpes de *Mus musculus*, CD1, BalbC e Rockefeller;

- Estudo de expressão, como resposta à exposição aos antimaláricos primaquina e artemisinina, nas mesmas estirpes, em fígado, intestino e sangue, dos:
 - Genes codificantes de reguladores de transcrição CAR e PXR;
 - Genes codificantes de transportadores *mdr1a* e *mdr1b*;
 - Genes codificantes de citocromos das sub-famílias CYP1A, 2B, 2C e 3A.

II. Material e Métodos

II.1. Material

II.1.1. Animais de laboratório

Neste trabalho foram utilizados, como modelos experimentais, três estirpes de *Mus musculus*: Balb/c, CD1 e Rockefeller. Foram utilizadas fêmeas com cerca de 6 semanas de idade, mantidas no Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, com livre acesso a dieta e água. Foram seguidas as normas de utilização de animais pela Direcção Geral de Veterinária.

II.1.2. Fármacos antimaláricos

Os fármacos utilizados foram a artemisinina e a primaquina. A artemisinina e seus derivados, são recomendados para utilização em combinações terapêuticas e a resistência parasitária é muito recente e limitada. Considerou-se importante iniciar o estudo da associação da farmacogenética a estes antimaláricos, começando pela regulação da expressão dos genes pela presença do fármaco

A escolha da primaquina deve-se ainda ao facto de estudos preliminares, indicarem diferenças na expressão de CYPs nestes animais (informação oral, F Nogueira, IHMT).

Os animais foram divididos em grupos de três fêmeas, existindo cinco grupos para cada estirpe.

		Estirpe de rato		
		CD1	Balb/c	Rockefeller
Grupo	Primaquina	3	3	3
	Controlo + PQ	3	3	3
	Artemisinina	3	3	3
	Controlo + Art	3	3	3
	Controlo -	3	3	3

Tabela II.1 – Grupos de estudo.

Como se pode verificar os grupos foram denominados consoante o fármaco administrado. Grupos de 3 murganhos de cada estirpe foram tratados com primaquina (2,28mg/Kg peso do animal em toma única, preparado em DMSO), denominando-se grupo primaquina; ao grupo artemisinina foi-lhes administrado o fármaco com mesmo nome (6 mg/Kg peso/dia, em DMSO, durante 5 dias com intervalos de 24 horas); ao terceiro grupo, designado de Controlo⁺ PQ foi-lhes administrado dose única de DMSO 5%; ao quarto grupo foi-lhes administrado DMSO 100% (durante 5 dias com intervalos de 24 horas), correspondendo ao grupo Controlo⁺ Art e o último grupo denominado grupo Controlo⁻ não foi administrado nenhum fármaco nem excipiente. Os animais foram eutanasiados com CO₂, 24 horas após a última dosagem e foram colhidas amostras de fígado e intestino (cerca de 100mg) e sangue (cerca de 100μl), em triplicado, as quais foram armazenadas a -70°C, para posterior extracção de RNA. A utilização de diferentes concentrações de DMSO deve-se a factores associados à diluição do fármaco.

II.2. Métodos

Para a extracção de RNA total e produção de cDNA a partir do mesmo é necessário ter alguns cuidados extra na preparação de soluções, limpeza de material e bancadas. Assim, todo o material utilizado na manipulação de amostras e as bancadas foram submetidos a um tratamento prévio com Rnase OUTTM (Gibco BRL). Por sua vez, as soluções foram todas preparadas com água bidestilada com dietilpirocarbonato (DEPC), um inibidor da actividade das enzimas Rnases. As soluções foram esterilizadas permitindo a hidrólise do DEPC, provocando a carboxilação dos grupos metilo dos resíduos de RNA (Solymosy *et al.*, 1968).

II.2.1. Extracção de RNA

O RNA total foi extraído de cada amostra usando o Reagente de TRIzol (Invitrogen) de acordo com as indicações do fabricante: as amostras de fígado e intestino foram maceradas e o sangue lisado em

850µl de TRIzol e incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente. A cada amostra foram adicionados 170 µl de clorofórmio (Merck), a mistura foi homogeneizada por agitação manual durante 15 segundos, seguindo-se uma incubação durante 2 minutos à temperatura ambiente, e uma centrifugação de 13000 rpm/15 min. A fase aquosa foi recuperada para um novo tubo, ao qual foram adicionados 425 µl de isopropanol (Sigma), seguindo-se uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, e uma nova centrifugação a 13000 rpm/10 min. O *pellet* de RNA obtido foi lavado com 850 µl de etanol (Merck) a 75% (v/v) e centrifugado a 8100 rpm/5 min. O RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µl de água bidestilada tratada com DEPC.

II.2.2. Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram tratadas com 2 U de *Dnase I* (Fermentas) e incubadas durante 20 minutos a 37°C. A mistura foi inativada pela adição de 2,5 µl de EDTA 25 mM (Fermentas), com incubação a 65°C durante 10 minutos. Desta forma, eliminou-se a interferência de DNA contaminante na reacção de PCR (*Polymerase chain reaction*) realizada a partir do DNA complementar (cDNA) sintetizado.

A transcrição reversa (RT-PCR) do RNA para cDNA foi realizada num volume de reacção de 30 µl, onde ao RNA tratado com *DnaseI* foram adicionados 200U de RevertAid™ M-MuLV-RT (Fermentas), 40U de RNaseOUT™ (Gibco BRL), 1X tampão M-MuLV-RT, 1µl de hexanucleotidos 10X (Boehringer Mannheim), 0,5 mM de dNTP's (Promega, USA), 9,5 µl de água DEPC. A mistura foi incubada a 37°C durante 60 minutos, tendo a reacção sido interrompida pela inativação da enzima, por aumento da temperatura até 95°C, durante 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

II.2.3. PCR em tempo real

Uma reacção de PCR permite a amplificação de uma sequência de ácidos nucleicos, sendo os resultados num PCR convencional avaliados no final do ensaio, com base somente na quantidade de produto final obtido. Numa reacção de PCR em tempo real é avaliada a acumulação de DNA amplificado ao longo da reacção, sendo os resultados medidos durante a fase exponencial da amplificação. Este tipo de reacção permite efectuar estudos de expressão absoluta e relativa. O estudo da expressão relativa constitui uma abordagem adequada para a avaliação das alterações nos níveis de expressão de um determinado gene (Pfaffl, 2001). Esta quantificação de um determinado gene é realizada com base na amplificação de um transcrito de referência, o qual funciona como um controlo endógeno, permitindo normalizar a quantidade de cDNA presente inicialmente na reacção, compensando as variações da concentração de cDNA inter-PCR (Pfaffl, 2001). A quantificação relativa descreve a alteração da expressão de um determinado gene em circunstâncias diferentes, pode ser, por exemplo em relação a um controlo não tratado ou ao longo do tempo. Não sendo necessário determinar o número de transcritos do gene mas apenas a variação da quantidade de transcritos do gene em condições diferentes (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Zakrajsek, 2000; Winer *et al.*, 1999). Neste trabalho, para a normalização da expressão dos genes em estudo foi utilizado como controlo endógeno a expressão de um fragmento do gene *β -actina I*, por ser um gene constitutivo.

II.2.3.1. Desenho de primers

De forma a obter uma maior eficiência e maior rendimento da reacção de PCR, deve-se ter em conta determinados factores, relacionados com a especificidade, no desenho de *primers*. Assim, algumas das considerações gerais a ter em atenção são:

- Tamanho da sequência do *primer* – oligonucleotidos com aproximadamente 18 a 24bp constituem *primers* bastante específicos;

- Temperatura de dissociação do par *primer*/sequência alvo – esta temperatura constitui um factor muito importante na especificidade da reacção de PCR;
- Complementaridade da sequência – a formação de dímeros ou homodímeros estáveis entre os *primers*, bem como a existência de auto complementaridade, podem diminuir o rendimento e a especificidade da reacção de PCR;
- Conteúdo Guanina/ Citosina (G/C) – teoricamente a composição de um *primer* deve apresentar um conteúdo de GC entre 45 e 50%. A inclusão de um ou dois resíduos G ou C na extremidade 3', reduz a possibilidade de hibridações inespecíficas, uma vez que as ligações estabelecidas entre resíduos G/C são mais fortes do que entre A/T.

As características dos *primers* desenhados, relativamente à temperatura de desnaturação (temperatura de *melting* - T_m) e à complementariedade da sequência escolhida, foram analisadas no programa Oligocalculator (<http://trishul.sci.gu.edu.au/tools/OligoCalculator.html>).

Gene	Primers	Sequência 5'→3'
<i>Cyp1A</i>	<i>Forward</i>	TATGGGGACGTGCTGCAGATCC
	<i>Reverse</i>	TTGAAGTCATCTCCCTGCCTCACC
<i>Cyp2B</i>	<i>Forward</i>	AAGAACAACCTGAGGTGTACCCC
	<i>Reverse</i>	TCTTCAGTGCCCCATTGGC
<i>Cyp2C</i>	<i>Forward</i>	AACCCAGAGATGTTTGACCCTGGGC
	<i>Reverse</i>	AAACAGCTCCATGCGGGCCAG
<i>Cyp3A</i>	<i>Forward</i>	AAAGGTTTCAGCAAGGAGAACAAGG
	<i>Reverse</i>	AAACCTCATGCCAAGGCAGTTCC
<i>mdr1a</i>	<i>Forward</i>	ATCGTGGTGATTTCAGAACGGCAAGG
	<i>Reverse</i>	AGAAGTAGATGCCCTTCTGCGCC
<i>mdr1b</i>	<i>Forward</i>	GGTGATTGAGAACGGCAAAGTCAAGG
	<i>Reverse</i>	AGAAGTAGATGCCCTTCTGCGC
<i>CAR</i>	<i>Forward</i>	CTCTTCTCCCCTGACAGACCCGG
	<i>Reverse</i>	TTGTTTCAGAATCAGCGCCATCTCC
<i>PXR</i>	<i>Forward</i>	TGAGCTGCGAAGCATCAACGC
	<i>Reverse</i>	AACTCTCGTATGAGTGGGGTTCGC
β -actina	<i>Forward</i>	ATCGGTGGCTCCATCCTGGCC
	<i>Reverse</i>	CTGCTTGCTGATCCACATCTGC

Tabela II.2 – Sequências de primers.

II.2.3.2. Condições de PCR

As reacções de PCR em tempo real foram realizadas num equipamento *iQ5 Real-Time PCR Detection System* (Bio-rad Laboratories) em placas de 96 “poços” (Bio-rad Laboratories), utilizando como fluorocromo o SYBR Green, do kit *iQTM SYBR[®] Green Supermix* (Bio-rad Laboratories), para a detecção do produto amplificado. O SYBR[®] Green é um fluorocromo que se liga apenas ao DNA de cadeia dupla, emitindo fluorescência. Assim, o aumento da quantidade de DNA corresponde a uma maior fluorescência (Fig.II.1).

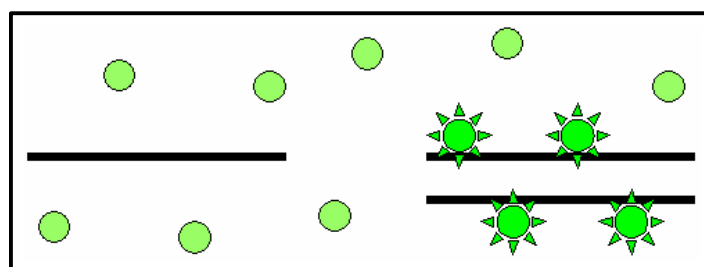


Fig. II.1 – Representação da emissão de fluorescência pelo SYBR[®] Green durante a reacção de PCR em tempo real (fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/SYBRGreen.htm>).

Os constituintes da mistura de reacção de PCR foram os apresentados na tabela seguinte:

Componentes	Volume (µl)
<i>iQTM SYBR[®] Green Supermix</i>	7,4
<i>Primer Forward/ Primer Reverse</i>	0,75/0,75
Água	5,1
cDNA	1

Tabela II.3 – Mistura e condições de reacção de PCR em tempo real.

Os ensaios foram realizados em triplicado para cada uma das amostras (fígado, intestino e sangue) de cada um dos grupos das 3 estirpes de murganhos dos grupos em estudo.

As condições térmicas da reacção de PCR em tempo real foram as seguintes: 95°C durante 10 minutos para activar a *Taqpolimerase*, desnaturação 1 minuto a 95°C e *annealing*/extensão a 66°C durante 30 segundos (40 ciclos). Em seguida, a temperatura foi aumentando de 0,3°C em 0,3°C, a cada 10 segundos, num total de 80 ciclos, de forma a obter uma curva de *melting*. Uma vez que a temperatura de *annealing* das subfamílias CYP estudadas é mais baixa, as reacções de PCR ocorreram de igual forma, mas com uma temperatura de *annealing* de 53°C.

II.2.3. Tratamento de dados

De forma a efectuar a quantificação relativa da expressão dos mesmos, utilizou-se a metodologia de PCR em tempo real com detecção por *SYBR Green I*, recorrendo ao método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a quantificação (Livak & Schmittgen, 2001). A quantificação da expressão dos genes alvo foi efectuada através da normalização com um gene constitutivo. Este, também denominado de *housekeeping gene*, está presente em todas as células nucleadas, uma vez que é vital para a sobrevivência da célula e a sua expressão é considerada estável nos diferentes tecidos (Pfaffl, 2001). Neste estudo utilizou-se o gene *β -actina I* como *housekeeping gene*.

Inicialmente procedeu-se à optimização da concentração dos primers, do protocolo e ao cálculo das eficiências das reacções de amplificação e eficiências relativas, de forma a validar o método. Após validação, a metodologia foi aplicada a cada situação.

II.2.3.1. Optimização da concentração dos primers

Antes da utilização dos primers, é necessário proceder-se à optimização das suas concentrações. Desta forma as concentrações testadas foram: 100 e 300 nM. Foram escolhidas as concentrações de primers que apresentassem maior eficiência.

II.2.3.2. Optimização das condições de PCR em tempo real

O estudo da especificidade da reacção de PCR em tempo real, efectuado pelo protocolo de dissociação, demonstrou que todas as reacções apresentavam uma elevada especificidade. O cálculo da especificidade das reacções de amplificação relativas a cada gene foi realizado pela observação da variação dos *Ct* (*cycle threshold*) com diluições seriadas de DNA. Para tal, o cDNA das amostras foi diluído em série de 1:10 e foi medido o *Ct* de cada diluição. Para a viabilidade dos ensaios, torna-se necessário que os valores de desvio padrão (DP) obtidos nos ensaios de quantificação relativa não ultrapassem o valor limite de 0,38 (Livak & Schmittgen, 2001). Pela observação dos valores de desvio padrão obtidos nos ensaios de quantificação relativa, verificou-se que os valores não ultrapassam o referido valor limite, existindo uma elevada reprodutibilidade entre as repetições, o que determina a viabilidade do estudo. Assim, os ensaios que apresentaram um desvio padrão superior a 0,38 foram excluídos deste estudo.

Concentração cDNA	β-Actina I		CAR		Cyp1A		Mdr1B	
	Média <i>Ct</i>	DP	Média <i>Ct</i>	DP	Média <i>Ct</i>	DP	Média <i>Ct</i>	DP
0,1	21,77	0,32	21,63	0,23	26,65	0,21	21,53	0,21
0,01	26,17	0,32	24,30	0,30	28,25	0,07	24,60	0,14
0,001	30,77	0,23	27,73	0,23	34,50	0,28	27,20	0,14
0,0001	33,05	0,21	31,50	0,10	36,90	0,28	30,93	0,15

Tabela II.4 – Média dos *Ct*s (triplicados) e respectivos desvios padrão (DP) nas reacções de amplificação de alguns genes estudados.

A partir dos valores de *Ct* obtidos desenhou-se um gráfico reproduzindo o logaritmo das diluições do DNA vs *Ct* e calculou-se a equação da recta ($y=mx + b$), exemplo na figura II.2.

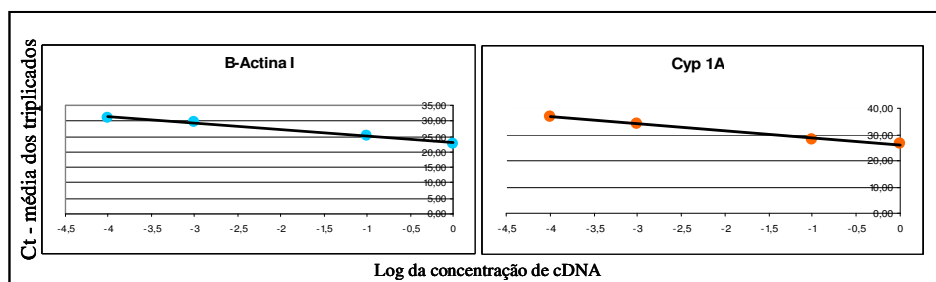


Fig. II.2 – Representação gráfica dos valores de *Ct* em função do log da concentração do DNA obtidos por PCR em tempo real, bem como representação da regressão que lhes está associada.

As eficiências das reacções de PCR (E) foram calculadas com recurso aos declives da recta (m) obtidos em cada gráfico, utilizando a equação $E=10^{(-1/\text{declive})}$, em que E=2 corresponde a uma eficiência máxima (Pfaffl, 2001; Cikos *et al.*, 2007). Assim, como se pode observar pela análise dos valores das eficiências das reacções, podemos afirmar que as reacções são eficientes (tabela III.5).

Gene	Declive (m)	Eficiência reacção
β -Actina I	3,43	2,60
Cyp1A	-2,6617	2,38
CAR	3,30	2,70

Tabela II.5 – Eficiências das reacções de amplificação do gene referência (β -Actina I) e dos genes alvo (Cyp1A e CAR).

Neste trabalho, seleccionou-se um modelo matemático que fosse adequado aos objectivos do estudo. Assim, para a quantificação relativa da expressão dos genes em estudo escolheu-se o modelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Neste modelo a variação da expressão (N) de um gene é dada pela seguinte equação: $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$,

em que: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{controlo interno}})_{\chi} - (Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{controlo interno}})_{\gamma}$,

onde a amostra χ corresponde àquela em que se estuda a variação de expressão do gene alvo e a amostra γ corresponde à amostra calibrador (em relação à qual se estuda a variação de expressão do gene alvo). Tendo-se efectuado a optimização das reacções e validado o método de tratamento de resultados, efectuou-se o estudo da expressão dos genes seleccionados.

A fim de detectar possíveis associações entre genes, efectuaram-se coeficientes de correlação (r) para determinar o grau dos mesmos. Os valores de coeficiente de correlação pode variar entre -1 e +1, possuindo diferentes significados (tabela II.6), O coeficiente de correlação de Pearson calcula-se segundo a seguinte fórmula:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}},$$

onde x_1, x_2, \dots, x_n e y_1, y_2, \dots, y_n são os valores medidos de ambas as variáveis. Para além disso,

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{e} \quad \bar{y} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n y_i$$

são as médias aritméticas de ambas as variáveis.

Valor de r	Interpretação
$r = 0$	As variações não ocorrem juntas.
$0 > r > -1$	As duas variáveis tendem a diminuir ou aumentar em conjunto.
$r = 1$	Correlação perfeita
$-1 > r > 0$	Uma variável aumenta à medida que a outra diminui.
$r = -1$	Correlação inversa ou negativa perfeita.

Tabela II.6 – Interpretação dos valores de r

III. Resultados

No intuito de tornar mais fácil a interpretação dos dados apresentados, este capítulo será organizado em dois sub-capítulos, organizados em função dos objectivos iniciais do trabalho, nos quais serão expostos os respectivos resultados:

- Estudo comparativo dos níveis de expressão basal dos genes factores de transcrição CAR e PXR, dos genes transportadores de fármacos *mdr1a* e *mdr1b* e das sub-famílias CYP nas estirpes de murganho CD1, BalbC e Rockefeller;
- Estudo de expressão dos genes como resposta à exposição aos antimaláricos primaquina e artemisinina, nas 3 estirpes de *Mus musculus*, em fígado, intestino e sangue:
 - Genes codificantes de reguladores de transcrição CAR e PXR e estudo da regulação dos genes CYP e MDR pelos mesmos;
 - Genes codificantes de transportadores *mdr1a* e *mdr1b*;
 - Genes codificantes de citocromos das sub-famílias CYP1A, 2B, 2C e 3A.

De forma a efectuar a quantificação relativa da expressão dos genes em estudo, utilizou-se a metodologia de PCR em tempo real com detecção por *SYBR[®] Green I*, recorrendo ao método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a quantificação (Livak & Schmittgen, 2001), utilizando o gene *β -actina I* como *housekeeping gene*, como referido anteriormente. Para verificar se existiam associações entre genes efectuou-se um coeficiente de correlação, indicando qual a relação entre eles.

III.1. Estudo comparativo dos níveis de expressão basal dos genes das sub-famílias

*CYP e dos genes *mdr1a* e *mdr1B*, *CAR* e *PXR**

Esta fase do trabalho teve como objectivo identificar eventuais diferenças ao nível da expressão basal dos genes das sub-famílias CYP, dos genes *mdr1a* e *mdr1b* (transportadores), *CAR* e *PXR* (factores de transcrição). Para efectuar o estudo da expressão basal, foi considerada a estirpe que apresentava menores níveis de expressão no controlo negativo de cada gene. Desta forma, considerou-se que a estirpe de referência seria Balb/c, sendo também a única estirpe que é consanguínea, esperando-se uma menor variabilidade entre os indivíduos/amostras de cada grupo.

Este estudo demonstrou que no tecido hepático as estirpes CD1 e Rockefeller, relativamente à estirpe Balb/c, apresentam um padrão de expressão basal muito semelhante em todos os genes estudados, apresentando de uma forma geral níveis de expressão superiores, sendo esta diferença mais evidente na estirpe Rockefeller, onde a diferença de expressão mais significativa é a da sub-família *Cyp2B*. Entre as estirpes CD1 e Rockefeller verifica-se maior discrepância nos genes *CAR*, e sub-família *Cyp2B* (Fig.III.1).

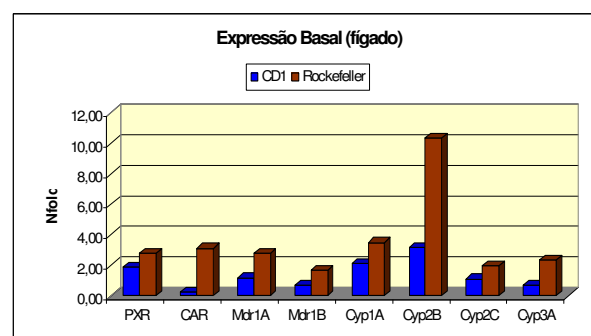


Fig. III.1 – Padrões de expressão basal a nível hepático

Relativamente à expressão basal no intestino, existem diferenças maiores entre estirpes, verificando-se que a estirpe CD1 apresenta valores de expressão maiores nos genes PXR, CAR, *mdr1b*, expressão mais baixa nas sub-famílias Cyp1A, Cyp2C e Cyp3A, apresentando uma expressão quase residual de *mdr1a* e na sub-família Cyp2B, relativamente à estirpe padrão. A estirpe Rockefeller apresenta

valores de expressão mais baixos nos genes *mdr1b* e sub-famílias Cyp1A, Cyp2B e expressão quase residual nos restantes genes (Fig.III.2).

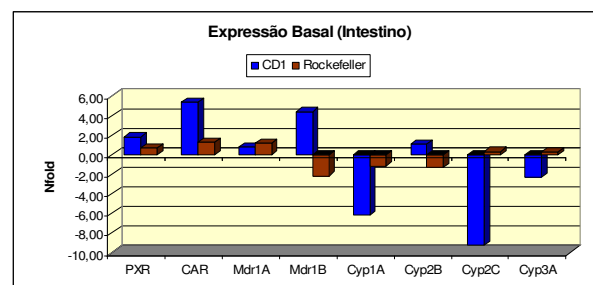


Fig. III.2 – Padrões de expressão basal a nível intestinal

III.2. Estudo de níveis expressão dos genes em resposta à exposição aos antimaláricos primaquina e artemisinina, em 3 estirpes de *Mus musculus*, em fígado, intestino e sangue

Um dos objectivos do presente trabalho era estudar os padrões de expressão dos genes CAR, PXR, *mdr1a*, *mdr1b*, e sub-famílias Cyp1A, Cyp2B, Cyp2C e Cyp3A no sangue, além do intestino e tecido hepático. No entanto, não foi possível quantificar a expressão dos genes nas amostras de sangue colhidas e tal facto não foi devido a um erro técnico uma vez que foi possível quantificar o gene da *β -actina1*, utilizado como calibrador, nas mesmas. O que deverá significar ausência de expressão destes genes neste tecido.

Com o objectivo de verificar se a presença dos antimaláricos, artemisinina e primaquina, origina uma resposta específica nos níveis de expressão dos genes das sub-famílias CYP1A, CYP2B, CYP2C e CYP3A, nas estirpes de murganho em estudo, foi estabelecido que um valor de *nfold* $\geq 1,5$ corresponde a um aumento de expressão do gene (Kiyosawa *et al.*, 2008). Este valor de *nfold* é relativo à expressão

apresentada na amostra correspondente, no ensaio realizado com o excipiente de cada fármaco. Foi efectuado o estudo de expressão do excipiente, de forma a verificar se a alteração da expressão dos genes estudados se devia exclusivamente ao antimalárico ou se o excipiente também influencia a expressão (estes resultados encontram-se apresentados no anexo I).

III.2.1. Genes codificantes de reguladores de transcrição PXR e CAR

III.2.1.1. Fígado

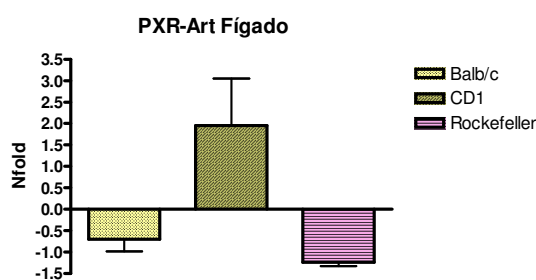


Fig. III.3 – Padrões de expressão de PXR no fígado (Art-artemisinina)

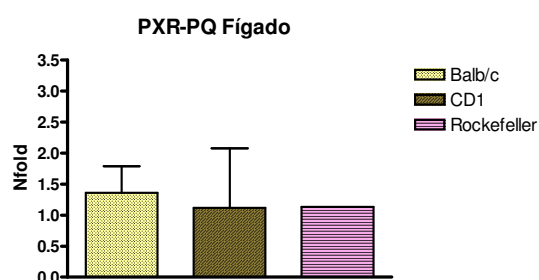


Fig. III.4 – Padrões de expressão de PXR no fígado (PQ-primaquina)

Relativamente ao gene PXR, através da análise dos resultados, verificou-se que após a exposição à artemisinina, nas estirpes Balb/c e Rockefeller não ocorre alteração significativa da expressão hepática, ocorrendo somente na estirpe CD1 ($nfold = 1,95$) (Fig. III.3). Após exposição a primaquina, não se verifica aumento da expressão em nenhuma das estirpes (Fig. III.4).

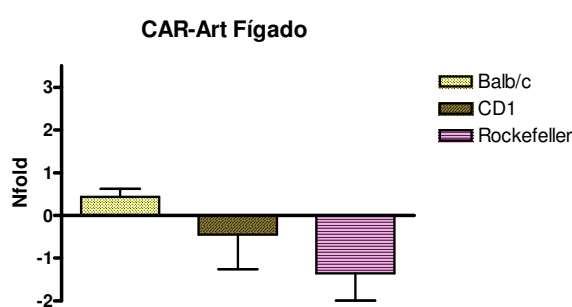


Fig. III.5 – Padrões de expressão de CAR (Art-artemisinina)

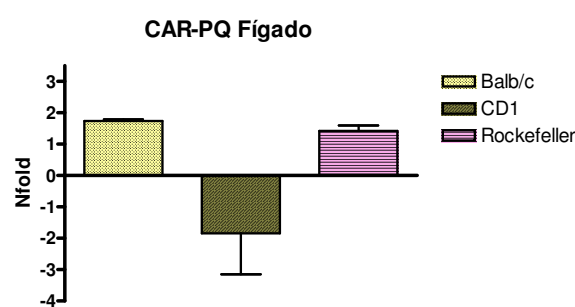


Fig. III.6 – Padrões de expressão de CAR (PQ-primaquina)

A expressão do outro gene regulador da transcrição estudado, o CAR, apresenta padrões muito variados consoante as estirpes. No tecido hepático, em resposta à exposição a artemisinina nenhuma das estirpes apresenta alteração significativa da expressão do gene em estudo (Fig. III.5). Em resposta à exposição a primaquina, na estirpe CD1 ocorre a inibição da expressão do gene ($nfold = -1,845$) relativamente à expressão sem exposição ao fármaco, por sua vez na estirpe Balb/c ocorre um aumento de expressão ($nfold = 1,74$) (Fig. III.6) no tecido hepático.

III.2.1.2. Intestino

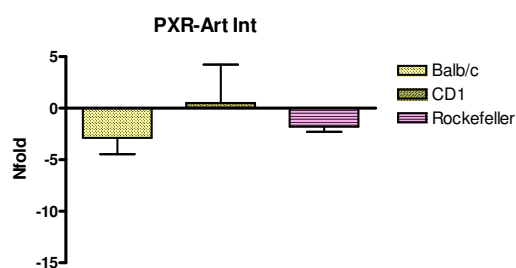


Fig. III.7 – Padrões de expressão de PXR no intestino (Art-artemisinina; Int-intestino)

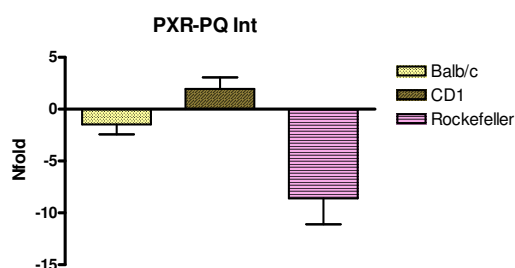


Fig. III.8 – Padrões de expressão de PXR no intestino (PQ-primaquina; Int-intestino)

Relativamente ao gene PXR, através da análise dos resultados, verificou-se que após a exposição a artemisinina, nas estirpes Balb/c e Rockefeller ocorre uma inibição da expressão do gene a nível intestinal relativamente à expressão sem exposição ao fármaco ($nfold = -2,85$ e $-1,79$, respectivamente), não ocorrendo alteração da expressão em CD1 (Fig. III.7). Após a exposição à primaquina, a estirpe Rockefeller mantém a expressão do gene inibida ($nfold = -8,585$), não se verificando alteração da expressão deste gene em Balb/c e CD1 (Fig. III.8).

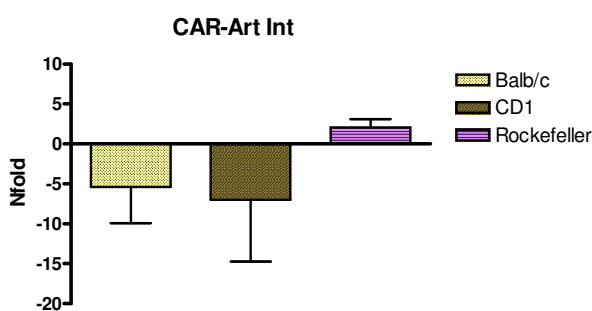


Fig. III.9 – Padrões de expressão de CAR (Art-artemisinina; Int-intestino)

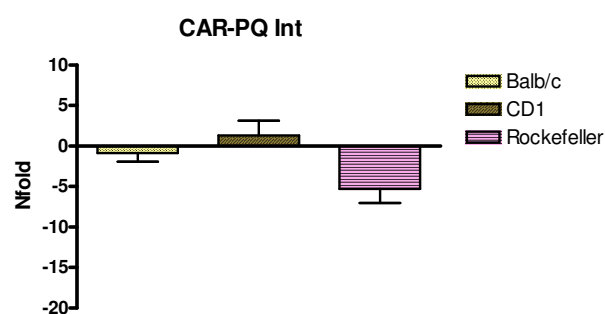


Fig. III.10 – Padrões de expressão de CAR (PQ-primaquina; Int-intestino)

Na estirpe Rockefeller, em resposta à exposição a artemisinina ocorre um aumento de expressão do gene CAR no tecido intestinal ($nfold = 2,065$), o que não acontece nas restantes estirpes, ocorrendo a inibição da expressão deste gene, relativamente à expressão sem fármaco ($nfold$ Balb/c = -5,4; CD1 = -7,015) (Fig.III.9). Após exposição a primaquina, somente na estirpe Rockefeller ocorre alteração da expressão, com inibição da expressão do gene CAR ($nfold = -5,305$).

III.2.1.3. Estudo da regulação dos genes CYP e MDR pelos factores de transcrição CAR e PXR

Foram efectuados os coeficientes de correlação entre os reguladores de transcrição e os transportadores de fármacos e as sub-famílias de citocromos estudadas. Pela análise dos resultados verificou-se que os coeficientes de correlação entre os genes variam consoante a estirpe, o tecido e o fármaco a que estão expostos. Assim, na estirpe Balb/c verificou-se que o gene PXR regula os genes das sub-família Cyps de forma semelhante ao gene CAR, no entanto verifica-se que a regulação da expressão dos transportadores, no tecido hepático, varia consoante o fármaco. Assim, no tratamento com artemisinina a expressão dos genes *mdr1a* e *mdr1b* ocorre em conformidade com gene PXR, ao contrário do que acontece com primaquina. A expressão de *Cyp3A* diminui à medida que a de ambos os reguladores

aumenta, no tecido hepático (pois apresentam valores entre -1 e 0). No tecido intestinal a expressão das sub-famílias estudadas aumenta em conformidade com PXR e CAR.

Na estirpe CD1, a nível hepático, tal como intestinal, a expressão dos genes do transportador de fármacos *mdr1b* e das sub-famílias Cyps estudadas se encontra em conformidade com os genes reguladores de transcrição, aumentando e diminuindo com estes, à excepção da sub-família Cyp1A que possui expressão inversa e do gene *mdr1a* cuja regulação pelos genes CAR e PXR sofre influência do fármaco. Desta forma, no tratamento com artemisinina a expressão do gene *mdr1a* ocorre em conformidade com gene PXR, ao contrário do que acontece com a primaquina.

Através da análise dos resultados, verificou-se que na estirpe Rockefeller, a expressão dos genes PXR e CAR pouco influencia a expressão das sub-famílias Cyp2B, Cyp2C e Cyp3A (pois tem valor de r muito próximo de 0) e que a expressão de Cyp1A é inversa aos reguladores de transcrição, em ambos os tecidos estudados. Por outro lado, a expressão dos transportadores de fármacos aumenta à medida que aumenta a dos reguladores de transcrição.

III.2.2. Genes codificantes de transportadores *mdr1a* e *mdr1b*

III.2.2.1. Fígado

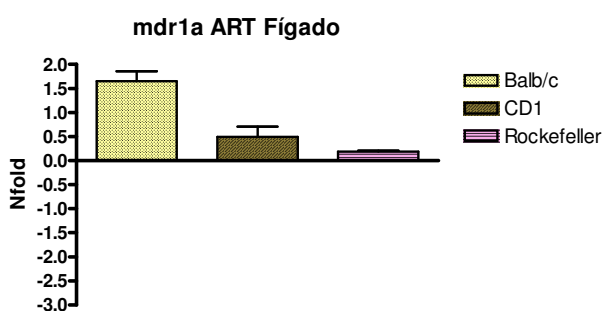


Fig. III.11 – Padrões de expressão de *mdr1a* (Art-artemisinina)

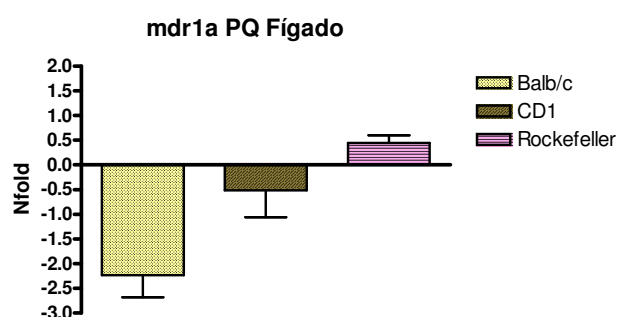


Fig. III.12 – Padrões de expressão de *mdr1a* (PQ-primaquina)

III. Resultados

No tecido hepático a única estirpe em que ocorre alteração da expressão do gene *mdr1a* é a estirpe Balb/c, com aumento de expressão em resposta à exposição à artemisinina (*nfold* = 1,65) e inibição face à primaquina (*nfold* = -2,235), relativamente à expressão sem fármaco (Fig. III.11 e Fig. III.12).

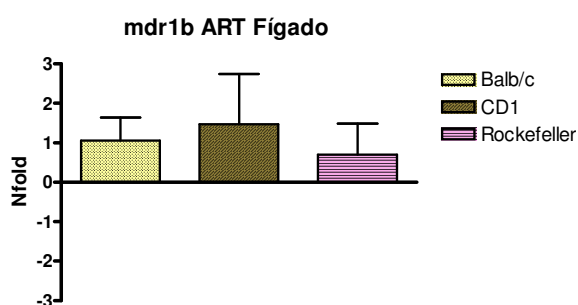


Fig. III.13 – Padrões de expressão de *mdr1b* (Art-artemisinina)

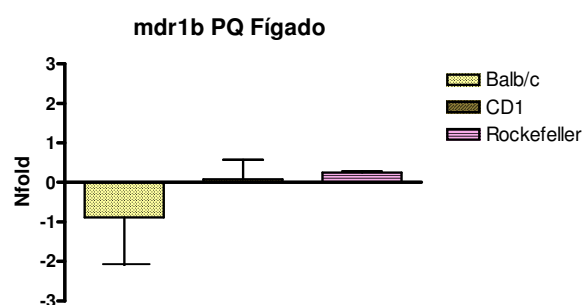


Fig. III.14 – Padrões de expressão de *mdr1b* (PQ-primaquina)

A nível hepático, somente a estirpe CD1 sofre um aumento da expressão do gene *mdr1b* em resposta à exposição a artemisinina (*nfold* = 1,515) (Fig. III.13), nas restantes estirpes não ocorre alteração da expressão do gene, tal como acontece após exposição a primaquina (Fig. III.14).

III.2.1.2. Intestino

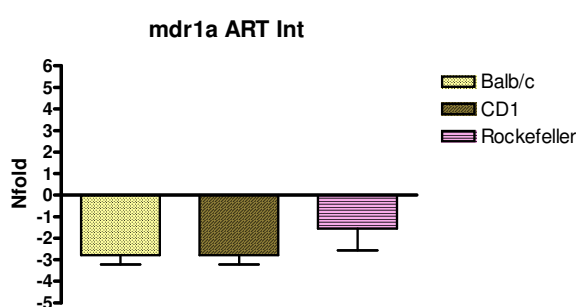


Fig. III.15 – Padrões de expressão de *mdr1a* (Art-artemisinina; Int-intestino)

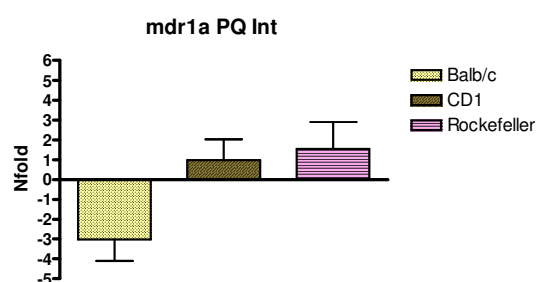


Fig. III.16 – Padrões de expressão de *mdr1a* (PQ-primaquina; Int-intestino)

A inibição da expressão do gene *mdr1a*, por exposição a artemisinina, no tecido intestinal, é transversal a todas as estirpes estudadas (*nfold* Balb/c = -2,785; CD1 = -2,785; Rockefeller = -1,56) (Fig. III.15).

III. Resultados

Por sua vez, quando expostas a primaquina, a única estirpe cuja expressão do gene é inibida é a Balb/c ($nfold = -3,025$), na estirpe Rockefeller a expressão do gene *mdr1a* é induzida ($nfold = 1,55$) e em CD1 não ocorre alteração da expressão (Fig. III.16).

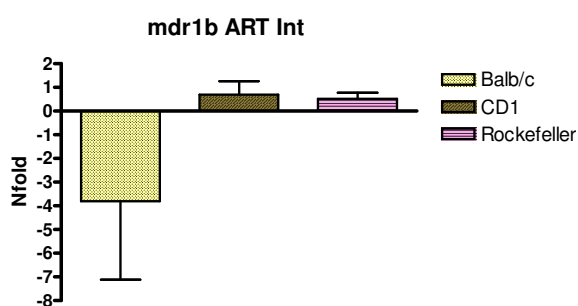


Fig. III.17 – Padrões de expressão de *mdr1b* (Art-artemisinina; Int-intestino)

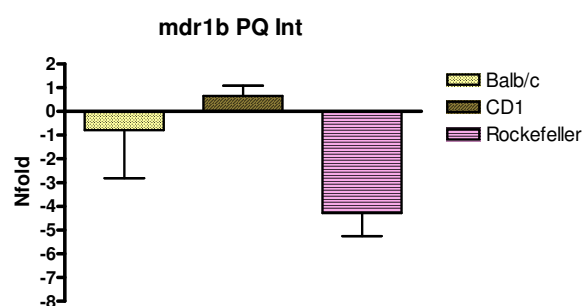


Fig. III.18 – Padrões de expressão de *mdr1b* (PQ-primaquina; Int-intestino)

A nível intestinal, somente as estirpes Balb/c e Rockefeller sofrem alteração da expressão do gene *mdr1b*, sendo esta inibida na estirpe Balb/c após exposição à artemisinina ($nfold = -3,81$) (Fig. III.17) e na Rockefeller após exposição à primaquina ($nfold = -4,285$) (Fig. III.18).

III.2.3. Genes codificantes de citocromos das sub-famílias CYP1A, 2B, 2C e 3A

III.2.3.1. Fígado

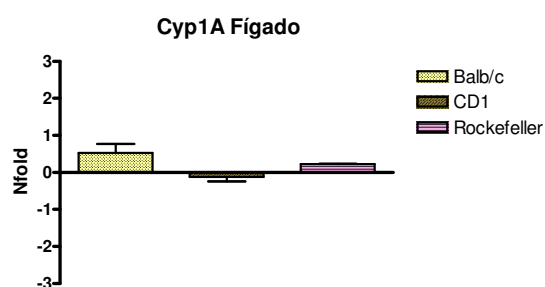


Fig. III.19 – Padrões de expressão de *Cyp1A* no fígado

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que em todas as estirpes estudadas não ocorre alteração da expressão dos genes da sub-família *Cyp1A* no tecido hepático (Fig. III.19).

III. Resultados

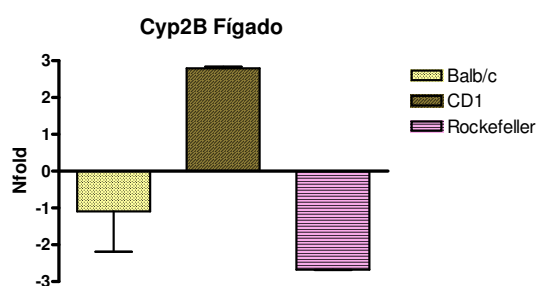


Fig. III.20 – Padrões de expressão de Cyp2B no fígado

A expressão de genes da sub-família Cyp2B apresenta variações consoante a estirpe e o

tecido estudados. Desta forma, no tecido hepático, a estirpe Rockefeller apresenta inibição da expressão de genes ($nfold = -2,675$) da sub-família Cyp2B e a estirpe CD1 um aumento da expressão ($nfold = 2,793$) (Fig. III.20).

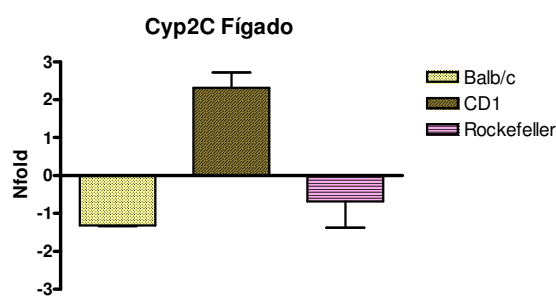


Fig. III.21 – Padrões de expressão de Cyp2C no fígado

Tal como a sub-família anteriormente analisada, também a sub-família Cyp2C apresenta padrões de expressão diferentes consoante o tecido e a estirpe. No tecido hepático somente a estirpe CD1 sofre alteração dos níveis de expressão, ocorrendo um aumento da mesma ($nfold = 2,32$) (Fig. III.21).

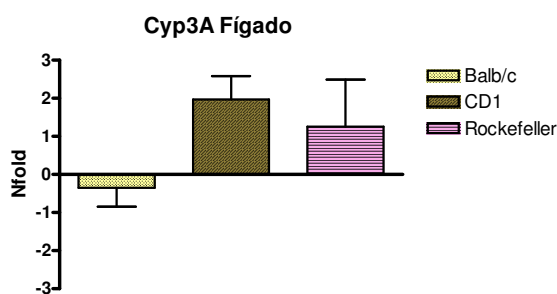


Fig. III.22 – Padrões de expressão de Cyp3A no fígado

A expressão de genes da sub-família Cyp3A apresenta padrões semelhantes à sub-família Cyp2C, somente com alteração considerada significativa da expressão hepática na estirpe CD1, ocorrendo o seu aumento ($nfold = 1,965$) (Fig. III.22).

III.2.3.2. Intestino

No tecido intestinal, ocorrem diferentes padrões de expressão dos genes da sub-família Cyp1A, com inibição da expressão nas estirpes Balb/c e Rockefeller, sendo mais significativa nesta última ($nfold = -11,015$) e aumento da expressão na estirpe CD1 (Fig. III.23).

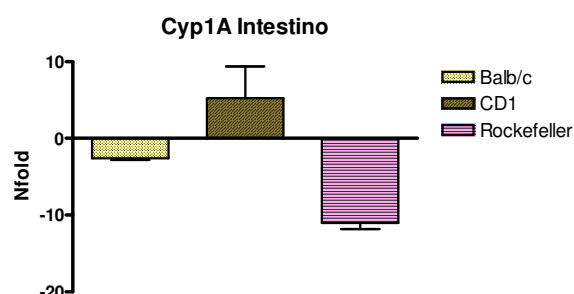


Fig. III.23 – Padrões de expressão de Cyp1A no intestino

No tecido intestinal os padrões de expressão são diferentes dos apresentados no tecido hepático, ocorrendo aumento de expressão de genes da sub-família Cyp2B na estirpe Rockefeller ($nfold = -1,823$), e inibição da expressão nas outras duas estirpes ($nfold$ Balb/c = -9,365; CD1 = -4,127) (Fig. III.24).

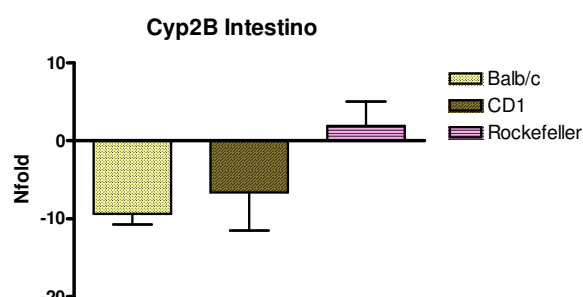


Fig. III.24 – Padrões de expressão de Cyp2B no intestino

Após análise dos resultados verificou-se que a nível do tecido intestinal ocorre uma inibição da expressão dos genes da sub-família Cyp2C em todas as estirpes estudadas ($nfold$ Balb/c = -2,525; CD1 = -10,53; Rockefeller = -1,903) (Fig. III.25).

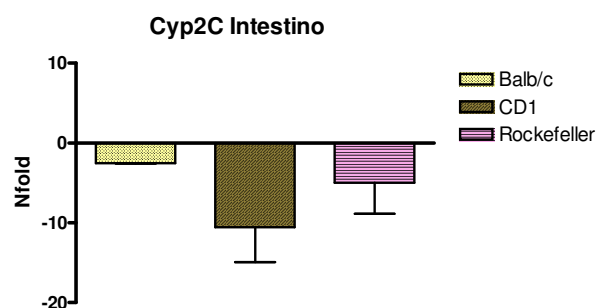


Fig. III.25 – Padrões de expressão de Cyp2C no intestino

A expressão de genes da sub-família Cyp3A apresenta padrões de expressão semelhantes à sub-família Cyp2C, com inibição intestinal em todas as estirpes (*nfold* Balb/c = -2; CD1 = -9,36; Rockefeller = -1,867) (Fig. III.26).

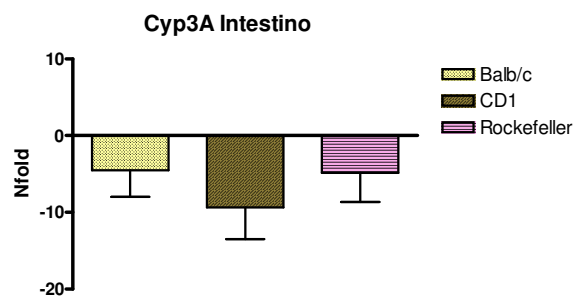


Fig. III.26 – Padrões de expressão de Cyp3A no intestino

Nas tabelas III.1 e III.2 encontra-se apresentado um resumo dos resultados obtidos.

Tecido/estirpe Genes	Fígado			Intestino		
	Balb/c	CD1	Rock.	Balb/c	CD1	Rock.
Cyp1A	=	=	=	↓	=	=
Cyp2B	=	↑	↓	↓	↓	↑
Cyp2C	=	↑	=	↓	↓	↓
Cyp3A	=	↑	=	↓	↓	↓
mdr1a	↑	=	=	↓	↓	↓
mdr1B	=	↑	=	↓	=	=
CAR	=	=	=	↓	↓	↑
PXR	=	↑	=	↓	=	↓

Tabela III.1 – Resumo dos padrões de expressão em resposta ao tratamento com artemisinina (Rock.-Rockefeller)

Tecido/estirpe Genes	Fígado			Intestino		
	Balb/c	CD1	Rock.	Balb/c	CD1	Rock.
Cyp1A	=	=	=	↓	↑	↓
Cyp2B	=	=	=	=	=	=
Cyp2C	=	=	=	=	=	=
Cyp3A	=	=	=	=	=	=
mdr1a	↓	=	=	↓	=	↑
mdr1B	=	=	=	=	=	↓
CAR	↑	↓	=	=	=	↓
PXR	=	=	=	=	↑	↓

Tabela III.2 – Resumo dos padrões de expressão em resposta ao tratamento com primaquina (Rock.-Rockefeller)

Assim, as 3 estirpes são distintas, verificando-se que a estirpe Balb/c é fortemente afectada com a artemisinina no que respeita a absorção intestinal, com possíveis consequências posteriores na actividade terapêutica, o mesmo se verificando, em menor grau com as outras 2 estirpes. No que respeita a primaquina, a estirpe Balb/c mostra redução da actividade CYP1A e mdr1a e no último caso, em oposição aos murganhos Rockefeller (Tabelas III.1 e III.2).

O estudo dos padrões de expressão dos genes dentro das sub-famílias foi iniciado, no entanto esses resultados não serão apresentados, pois devido à limitação de tempo não foi possível terminar esse estudo.

IV. Discussão

Actualmente, um dos maiores entraves ao controlo eficaz da malária tem por base a resistência dos plasmódios à maioria dos antimaláricos disponíveis (Golenser *et al.*, 2006). Assim, é de grande importância esclarecer os outros mecanismos associados à capacidade apresentada pelo parasita para sobreviver, na presença de fármaco, sendo um destes mecanismos associado à capacidade do mamífero hospedeiro de absorver e metabolizar correctamente os fármacos antimaláricos, de forma a destruir o parasita. Assim, estudamos o envolvimento da farmacogenética neste fenótipo de susceptibilidade a dois antimaláricos, uma vez que se sabe que polimorfismos, principalmente mutações pontuais (SNPs), nos genes codificantes de enzimas metabolizadores e transportadores de fármacos resultam em capacidades metabólicas bastante distintas, resultando em indivíduos com farmacodinâmicas diferentes (Cavaco *et al.*, 2003). Esta variabilidade inter-individual na resposta às diferentes classes de fármacos é relativamente bem conhecida. No entanto, existem poucos estudos que associem os polimorfismos e a variabilidade à resposta terapêutica aos antimaláricos usados e sobretudo nos modelos de roedores tão utilizados na selecção de parasitas resistentes na investigação experimental (Cavaco *et al.*, 2005).

Os polimorfismos existentes em cada um dos genes em estudo encontram-se relativamente bem caracterizados, estando já alguns deles associados a enzimas com maior ou menor capacidade metabólica. Em relação aos antimaláricos apenas muito recentemente foram iniciados estudos com o objectivo de avaliar esta associação (Cavaco *et al.*, 2006).

Para este estudo, foram seleccionadas 3 estirpes de *Mus musculus*, de forma a poder compará-las, em amostras de fígado e intestino, tecidos de grande relevância para a metabolização de fármacos, onde o metabolismo oxidativo dos fármacos ocorre devido à acção das enzimas CYPs. A acção desta família de enzimas metabolizadoras leva à formação de produtos com polaridade aumentada, de forma a serem rapidamente eliminados. Actualmente, o estudo destas reacções possui uma elevada relevância, tendo em conta que se avaliam os padrões de expressão das enzimas metabolizadoras de cada fármaco podendo associá-los à disponibilidade do fármaco e consequentemente a padrões de susceptibilidade a

determinado fármaco. Foram ainda estudados os níveis de expressão destes genes no sangue, com menor sucesso.

Dada a biodisponibilidade de determinado fármaco ser afectada pela sua metabolização e pelo seu transporte, efectuámos um estudo sobre a variação dos níveis de expressão basal dos CYP450 metabolizadores de antimaláricos e transportadores MDR, bem como a regulação da expressão destes genes quer pela presença de antimalárico, quer pela variação nos níveis de expressão dos factores de transcrição.

As colheitas das amostras foram efectuadas 24h após a administração da última dosagem de fármaco de acordo com outros estudos efectuados com objectivos semelhantes (Martignoni *et al.*, 2006), uma vez que pouco se sabe sobre a metabolização dos antimaláricos em estudo.

As sub-famílias de CYP (1A, 2B, 2C e 3A) estudadas foram seleccionadas com base no conhecimento do seu envolvimento na metabolização dos antimaláricos em estudo a primaquina e a artemisinina.

Dado o objectivo deste estudo consideramos importante utilizar um controlo sem tratamento, designado de controlo negativo, e outro controlo onde os animais foram tratados apenas com o excipiente dos fármacos em estudo, de forma a percebermos se por si só o excipiente provocaria algum efeito na expressão dos genes em estudo. O estudo da expressão dos referidos genes como resposta à primaquina e à artemisinina, foi efectuado tendo como calibrador a sua expressão nos animais tratados com o respectivo excipiente.

Um dos objectivos do presente trabalho era estudar os padrões de expressão dos genes CAR, PXR, *mdr1a*, *mdr1b*, e sub-famílias *Cyp1A*, *Cyp2B*, *Cyp2C* e *Cyp3A* no sangue. No entanto, tal não foi conseguido sendo estes resultados negativos não apresentados e ainda não explicados definitivamente. Foi contudo possível amplificar o gene da β -actina I utilizado como gene controlo.

A expressão basal dos genes em estudo varia consoante as estirpes, em ambos os tecidos estudados. Para este trabalho foi considerada como estirpe referência a estirpe Balb/c dado ser esta estirpe a que menor variabilidade apresenta. No tecido hepático as estirpes apresentam níveis de expressão dos genes

estudados superiores à estirpe referência, sendo a diferença mais evidente na sub-família Cyp2B, em Rockefeller. No tecido intestinal existem discrepâncias maiores entre estirpes. Assim, a estirpe Rockefeller possui valores de expressão quase residual em todos os genes, exceptuando o gene *mdr1b* e sub-famílias Cyp1A e 2B. Na estirpe CD1 os reguladores de transcrição e *mdr1b* apresentam uma expressão basal mais elevada enquanto as sub-famílias Cyp1A, 2C e 3A apresentam uma expressão mais baixa que a estirpe de referência.

Como esperado, as estirpes estudadas (Balb/c, CD1 e Rockefeller) respondem de forma diferente quando expostas aos fármacos antimaláricos utilizados (artemisinina e primaquina), expressando de diferentes formas os genes em estudo (Cavaco *et al.*, 2005; Martignoni *et al.*, 2006; Kawase *et al.*, 2008).

De acordo com Baird e colaboradores (2004), a primaquina é um fármaco rapidamente absorvido no tracto gastrointestinal, concentrando-se no fígado, o que é coerente com os resultados obtidos na estirpe Rockefeller, em que a expressão dos genes PXR, CAR, *mdr1b* e da sub-família Cyp1A se encontra inibida no tecido intestinal. Contudo dever-se-á efectuar um estudo com dosagens distintas.

Após tratamento com artemisinina a expressão dos genes da sub-família Cyp1A não sofre qualquer alteração no tecido hepático e intestinal, à semelhança do que foi verificado por Bapiro e colaboradores (2002) com o mesmo antimalárico. No entanto, este estudo verificou também que a primaquina em CD1 é um forte indutor da expressão da sub-família Cyp1A, o que não se verificou nas estirpes Balb/c e Rockefeller, no tecido intestinal (não ocorrendo alteração da expressão no tecido hepático). As sub-famílias Cyp2C e 3A apresentam padrões de expressão semelhantes expressando-se no tecido hepático da estirpe CD1 estando a expressão inibida no tecido intestinal de todas as estirpes, o que é consistente com estudos anteriores que afirmam que as duas sub-famílias possuem indutores de expressão semelhantes (Pascussi *et al.*, 2003). Os genes da sub-família Cyp2B apresentam padrões de expressão semelhantes às sub-famílias Cyp2C e 3A nas estirpes CD1 e Balb/c. No entanto, os padrões de expressão na estirpe Rockefeller são diferentes, estando a expressão desta sub-família induzida no

tecido intestinal. Outros estudos sugerem que expressão de Cyp2B no tecido hepático é induzida por outros xenobióticos (Olinga *et al.*, 2008), o que não se verificou neste estudo.

Com base nos resultados obtidos verificou-se que a expressão dos genes *mdr1a* e *mdr1b* varia consoante o fármaco e o tecido. Assim, após tratamento com artemisinina ocorre indução da expressão de *mdr1a* na estirpe Balb/c e *mdr1b* na estirpe CD1, no tecido hepático, e inibição de *mdr1a* em todas as estirpes e de *mdr1b* só em Balb/c, no intestino. Após a exposição a primaquina a expressão, no tecido intestinal, de *mdr1b* encontra-se inibida na estirpe Rockefeller, enquanto a expressão do gene *mdr1a* se encontra induzida. De acordo com Murakami e colaboradores (2008) a expressão de *mdr1a* a nível intestinal varia ao longo do ciclo circadiano do indivíduo, factor que não foi tomado em atenção neste estudo em que o fármaco foi sempre administrado no período da tarde, no mesmo intervalo de 24 horas para cada administração no caso da artemisinina.

Tal como os restantes genes, também os genes reguladores de transcrição estudados, CAR e PXR, possuem padrões de expressão que variam com fármaco e tecido. Desta forma, em resposta ao tratamento com primaquina a expressão de CAR e PXR encontra-se inibida no tecido intestinal, na estirpe Rockefeller, enquanto na estirpe CD1 a expressão de PXR se encontra induzida. Kiyosawa e seus colaboradores (2008) verificaram que a expressão do gene CAR se encontra inibida no tecido hepático, à semelhança do verificado na estirpe CD1, em resposta ao tratamento com primaquina. Após exposição à artemisinina a expressão do PXR no tecido hepático encontra-se induzida na estirpe CD1 e inibida no tecido intestinal nas estirpes Balb/c e Rockefeller (Tabelas III.1 e III.2)

Os reguladores de transcrição CAR e PXR desempenham um papel crucial na activação de genes que codificam enzimas metabolizadoras de fármacos, como os citocromos P450, nomeadamente membros das sub-famílias Cyp2B e Cyp3A (Ueda *et al.*, 2002; Shenoy *et al.*, 2004; Kiyosawa *et al.*, 2008), e transportadores de fármacos (Kanno *et al.*, 2004). No entanto, no presente trabalho verificou-se que o papel dos reguladores de transcrição CAR e PXR variava consoante a estirpe, o tecido e o fármaco aplicado, demonstrando os resultados que para além da activação, estes reguladores de transcrição

também provocam a inibição dos genes em causa. Na análise dos resultados, e ao efectuar uma correlação entre os reguladores de transcrição, os transportadores de fármacos e as sub-famílias CYP, verifica-se que na estirpe Balb/c, na presença de artemisinina somente os genes transportadores de fármacos possuem expressão activada no tecido hepático, não influenciando a expressão das sub-famílias Cyps estudadas. Após exposição à primaquina os transportadores são inibidos pelo CAR e activados pelo PXR. No tecido intestinal somente a expressão das sub-famílias Cyp2B e Cyp3A é activada, não havendo alteração da expressão dos genes transportadores, em resposta à artemisinina na mesma estirpe. Na estirpe CD1 a regulação da expressão apresenta padrões diferentes, com activação da expressão dos transportadores de fármacos e das sub-famílias Cyps, à excepção de Cyp1A cuja expressão é inibida (no tecido hepático). No tecido intestinal verificou-se que a regulação da expressão ocorre de forma igual ao tecido hepático, contudo só quando os sujeitos são submetidos a tratamento com artemisinina, pois a primaquina não provoca alteração na regulação. Na estirpe Rockefeller os genes reguladores de transcrição CAR e PXR influenciam de forma diferente das restantes estirpes, inibindo a expressão dos citocromos e activando a dos transportadores no tecido hepático. Contudo, no tecido intestinal, o gene PXR tende a activar a expressão dos transportadores de fármacos e as sub-famílias dos citocromos, à excepção da Cyp1A. O gene CAR já apresenta diferenças consoante o fármaco, assim, na presença de artemisinina activa os transportadores e com primaquina inibe-os. Nas estirpes CD1 e Rockefeller a correlação entre os reguladores de transcrição e as sub-famílias Cyps estudadas encontram-se em conformidade com estudos anteriores, demonstrando a regulação da expressão das sub-famílias Cyp2B, 2C e 3A (Ueda *et al.*, 2002; Pascussi *et al.*, 2003; Marini *et al.*, 2007) e não de Cyp1A.

Assim, este trabalho demonstra a existência de uma grande variabilidade entre estirpes da expressão dos genes em estudo, o que consequentemente afectará a bio-disponibilidade do fármaco no organismo, resultando na exposição a diferentes concentrações de fármaco, podendo este facto contribuir para a adaptação e selecção de parasitas do género *Plasmodium* resistentes a antimaláricos. Os resultados

obtidos neste estudo evidenciam a regulação da expressão dos CYP e transportadores pela presença dos fármacos estudados, demonstrando ainda que existe outro mecanismo de regulação da expressão dos referidos genes, ao nível da transcrição pelos genes CAR e PXR. A indução de enzimas metabolizadoras de fármacos e transportadores contribui para um aumento de destoxificação do organismo, no entanto, podem levar a interações medicamentosas afectando a eficácia dos fármacos (Olinga *et al.* 2008). Outro factor responsável pela ineficácia terapêutica é a variabilidade inter-individual.

V. Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a heterogeneidade de padrões de expressão entre os tecidos estudados em resposta aos antimaláricos utilizados. Temos como exemplo o gene *mdrla*, cuja expressão se encontra aumentada no tecido hepático em resposta à exposição a artemisinina, e possui expressão inibida após exposição a primaquina (na estirpe Balb/c). Os genes da sub-família Cyp2B são outro exemplo da heterogeneidade entre tecidos, ocorrendo aumento de expressão do mesmo no tecido hepático e inibição no tecido intestinal (na estirpe CD1). Para além da heterogeneidade entre tecidos e antimaláricos, também foi verificada heterogeneidade entre estirpes, como por exemplo o gene *CAR* no tecido intestinal, cuja expressão se encontra inibida nas estirpes Balb/c e CD1 e induzida na estirpe Rockefeller.

Este estudo demonstrou que a selecção de estirpes de murganhos para estudos associados a fármacos requer investigação anterior, com utilização cuidadosa dos fármacos seleccionados, uma metodologia compatível com os tempos de absorção dos mesmos, de forma a melhor se poder avaliar as consequências dos tratamentos utilizados. Este estudo confirma que a farmacogenética e a farmacocinética são de elevada importância sobretudo em estudos de fármaco-susceptibilidade aos antimaláricos.

VI. Perspectivas de trabalho futuro

Este trabalho englobou um estudo de expressão dos genes CAR, PXR, *mdr1a*, *mdr1b* e sub-famílias Cyp1A, 2B, 2C e 3A e de regulação destes pelos genes CAR e PXR, contribuindo com informação relevante e original relativamente aos padrões de expressão dos mesmos em resposta ao tratamento com primaquina e artemisinina.

Tendo em conta a problemática da resistência aos antimaláricos e consequente falência terapêutica, consideramos importantes estudos de farmacogenética semelhantes ao efectuado, nestes e noutros antimaláricos de interesse terapêutico ou profiláctico em áreas endémicas, incluindo outros factores, nomeadamente:

- Realizar uma quantificação sérica do fármaco antimalárico de forma a estudar a associação entre a expressão dos Cyp e transportadores e a concentração de fármaco;
- Estudar o padrão de expressão e quantificação de fármaco ao longo de um período de 0h-48h após a administração da última dose de fármaco, com colheitas regulares durante todo o período.

VII. Referências Bibliográficas

VII. Referências bibliográficas

- ADJUIK, M., BABIKER, A., GARNER, P., OLLIARO, P., TAYLOR, W., WHITE, N. 2004. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet*, Jan 3, **363**(9402):9-17.
- ALARID, E.T., 2006. Lives and times of nuclear receptors. *Mol Endocrinol*, **20**:1972-81.
- AUBOUY, A., BAKARY, M., KEUNDJIAN, A., MBOMAT, B., MAKITA, J.R., MIGOT-NABIAS, F., COT, M., LE BRAS, J., DELORON, P. 2003. Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxinepyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan; **47**(1): 231-7.
- ÁVILA, J.C., VILLAROEL, R., MARQUINO, W., ZEGARRA, J., MOLLINEDO, R., RUEBUSH, T.K., 2004. Efficacy of mefloquine and mefloquine-artesunate for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon region of Bolivia. *Tropical Medicine and International Health*, Feb; **9**(2): 217-21.
- AWAD, M.I., ALKADRU, A.M., BEHRENS, R.H., BARAKA, O.Z., ELTAYEB, I.B., 2003. Descriptive study on the efficacy and safety of artesunate suppository in combination with other antimalarials in the treatment of severe malaria in Sudan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Feb; **68**(2):153-8.
- BAIRD, J.K., HOFFMAN, S.L., 2004. Primaquine therapy for Malaria, *CID* 2004:39.
- BALINT GA., 2001. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol Ther.* May-Jun; **90**(2-3):261-5.
- BALLEREAU, F., PRAZUCK, T., SCHRIVE, I., LAFLEURIEL, M.T., ROZEC, D., FISCH, A., LAFAX, C., 1997. Stability of essential drugs in the field: results of a study conducted over a two-year period in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jul; **57**(1):31-6.
- BARENNE, H., NAGOT, N., VALEA, I., KOUSSOUBE-BALIMA, T., OUEDRAOGO, A., SANOU, T., YE, S., 2004. A randomized trial of amodiaquine and artesunate alone and in combination for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in children from Burkina Faso. *Tropical Medicine and International Health*, Apr; **9**(4): 438-44.
- BENNETT, T.N., PAGUIO, M., GLIGORIJEVIC, B., SEUDIEU, C., KOSAR, A.D., DAVIDSON, E., ROEPE, P.D. 2004. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May; **48** (5): 1807-10.
- BHISUTTHIBHAN, J., PAN, X.Q., HOSSLER, P.A., WALKER, D.J., YOWELL, C.A., CARLTON, J., DAME, J.B., MESHNICH, S.R., 1998. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *JBC*, **273** (26): 16192-16198.
- BJÖRKMAN A., BHATTARAI A., 2005. Public health impact of drug resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop.* Jun; **94**(3):163-9.
- BLOLAND, P.B., 2003. A contrarian view of malaria therapy policy in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Feb; **68** (2): 125-6.

- BRAS J., DURAND R. 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol.* Apr; **17**(2):147-53.
- BRITISH ASSOCIATION OF DERMATOLOGIST; July, 2006. Patient information leaflet.
- BROOKS, G., BUTEL, J., MORSE, S., 2001. *Microbiologia médica* (22ª Edição), McGraw Hill, Rio de Janeiro, pp 797-820.
- BURK O., ARNOLD K.A., NUSSLER A.K., SCHAEFFELER E., EFIMOVA E., AVERY B.A., AVERY M.A., FROMM M.F., EICHELBAUM M., 2005. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol.* Jun; **67**(6):1954-65.
- CAMPBELL P., BARUAH S., NARAIN K., ROGERS C.C., 2006. A randomized trial comparing the efficacy of four treatment regimens for uncomplicated *falciparum* malaria in Assam state, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Feb; **100**(2):108-18.
- CHIRULLI, V., LONGO, V., MARINI, S., MAZZACCARO, A., FIORIO, R., GERVASI, P.G., 2004; CAR and PXR expression and inducibility of CYP2B and CYP3A activities in rat and rabbit lungs. *Life Sciences*, **76**:2535–2546.
- CHOUDHARY, D., JANSSON, I., STOILOV, I., SARFARAZI, M., SCHENKMAN, J.B., 2005. Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues. *Arch Biochem Biophys*, **436**:50-61.
- CIKOS, S., BUKOVSKÁ, A., KOPPEL, J., 2007. Relative quantification of mRNA comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, **8**:113.
- CORCHERO, J.B., PIMPRALE, S., KIMURA, S., GONZALEZ, F.J., 2001. Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics*, **11**:1-6.
- COSTA, M., KIRALJ, R., FERREIRA, M., 2007. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme, *Quim. Nova*, **30** (1): 25-31.
- COUTURE L., NAHS, J.A., TURGEON J., 2006. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol Rev.*, **14**:244-58.
- CROWE, A., ILETT, K.F., KARUNAJEEWA, H.A., BATTY, K.T., DAVIS, T.M., 2006. Role of P-glycoprotein in absorption of novel antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**:3504-6.
- DAI, D., ZELDIN, D.C., BLAISDELL, J.A., CHANAS, B., COULTER, S.J., GHANAYEM, B.I., GOLDSTEIN, J.A., 2001. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics*, **11**:597-607.
- DELFINO, R. T.; SANTOS-FILHO, O. A., FIGUEROA-VILLAR, J.D., 2002. Type 2 antifolates in the chemotherapy of *falciparum* malaria. *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**(6):727-741.

VII. Referências bibliográficas

- DEPOORTERE, E., GUTHMANN, J.P., SIPILANYAMBE, N., NKANDU, E., FERMON, F., BALKAN, S., LEGROS, D., 2004. Adherence to the combination of sulphadoxine-pyrimethamine and artesunate in the Maheba refugee settlement, Zambia. *Tropical Medicine and International Health*, Jan; **9** (1): 62-7.
- DJIMDE, A.A., DOUMBO, O.K., TRAORE, O., GUINDO, A.B., KAYENTAO, K., DIOURTE, Y., NIARE-DOUMBO, S., COULIBALY, D., KONE, A.K., CISSOKO, Y., TEKETE, M., FOFANA, B., DICKO, A., DIALLO, D.A., WELLEMS, T.E., KWIATKOWSKI, D., PLOWE, C.V., 2003. Clearance of drugresistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Nov; **69** (5):558-63.
- DRAKELEY, C.J., JAWARA, M., TARGETT, G.A., WALRAVEN, G., OBISIKE, U., COLEMAN, R., PINDER, M., SUTHERLAND, C.J. 2004. Addition of artesunate to chloroquine for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Gambian children causes a significant but short-lived reduction in infectiousness for mosquitoes. *Tropical Medicine and International Health*, Jan; **9** (1): 53-61.
- DUFFY, P.E., MUTABINGWA, T.K., 2004. Drug combinations for malaria: time to ACT? *Lancet*, Jan 3; **363** (9402): 3-4.
- DURASINGH, M.T., JONES, P., SAMBOU, I., VON SEIDLEIN, L., PINDER, M., WARHURST, D.C. 2000. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Molecular Biochemical Parasitology*, Apr 30; **108**(1):13-23.
- DURASINGH, M.T., ROPER, C., WALLIKER, D., WARHURST, D.C. 2000 b. Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*, May; **36**(4):955-61.
- DURASINGH, M.T., VON SEIDLEIN, L.V., JEPSON, A., JONES, P., SAMBOU, I., PINDER, M., WARHURST, D.C. 2000 c. Linkage disequilibrium between two chromosomally distinct loci associated with increased resistance to chloroquine in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, Jul; **121**(Pt1):1-7.
- EKINS, S., RESCHLY, E.J., HAGEY, L.R., KRASOWSKI, M.D., 2008. Evolution of pharmacologic specificity in the pregnane x receptor. *BMC Evolutionary Biology*. **8**:103.
- EVANS, W.E., MCLEOD, H.L., 2003. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets and side effects. *N Eng J Med*. **348**(6):538-49.
- FRANCESCONI, P., FABIANI, M., DENTE, M. G., LUKWIYAA, M., OKWEYA, R., OUMAA, J., OCHAKACHONA, R., CIAN, F., DECLICH, S., 2001. HIV, malaria parasites, and acute febrile episodes in Ugandan adults: a case-control study, *AIDS 2001*. **15**:2445-2450.
- FREDERICH, M., DOGNE, J.M., ANGENOT, L., DE MOL, P. 2002. New trends in anti-malarial agents. *Current Medicinal Chemistry*, Aug; **9** (15): 1435-56.

VII. Referências bibliográficas

- GASASIRA, A.F., DORSEY, G., NZARUBARA, B., STAEDKE, S.G., NASSALI, A., ROSENTHAL, P.J., KAMYA, M.R., 2003. Comparative efficacy of aminoquinoline-antifolate combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Kampala, Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Feb; **68** (2): 127-32.
- GIAO, P.T., BINH, T.Q., KAGER, P.A., LONG, H.P., VAN THANG, N., VAN NAM, N., DE VRIES, P.J., 2001. Artemisinin for treatment of uncomplicated falciparum malaria: is there a place for monotherapy? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Dec; **65** (6):690-5.
- GOLDSTEIN, J.A., 2001. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *J Clin Pharmacol*, 52:349-355.
- GOLENSER, J., WAKNINE, J.H., KRUGLIAK, M., HUNT, N.H., GRAU, G.E., 2006. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *International Journal for Parasitology*, Dec; **36** (14): 1427-1441.
- GOMEZ, E.A., JURADO, M.H., CAMBON, N., 2003. Randomised efficacy and safety study of two 3-day artesunate rectal capsule/mefloquine regimens versus artesunate alone for uncomplicated malaria in Ecuadorian children. *Acta Tropica*, Dec; **89**(1):47-53.
- GORDI, T., XIE, R., JUSKO, W.J., 2005. Semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of the antimalarial effect artemisinin, *British Journal of Clinical Pharmacology*. **60**(6):594-604.
- GÚZMAN, V., CARMONA-FONSECA, J., 2006. El citocromo P-450 y la resposta terapêutica a los antimaláricos. *Rev Panam Salud Publica*. **19**(1):9-22.
- HARMSSEN, S., MEIJERMAN, I., BEIJNEN, J.H., SCHELLENS, J.H.M., 2007. The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. *Cancer Treatment Reviews*. **33**:369-380.
- HASTINGS, I.M., D'ALESSANDRO, U., 2000. Modelling a predictable disaster: the rise and spread of drug-resistant malaria. *Parasitology Today*, Aug; **16** (8): 340-7.
- HAY, S.I., GUERRA, C.A., TATEM, A.J., NOOR, A.M., SNOW R.O., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*, **4**:327-36.
- HAYESHI R., MASIMIREMBWA C., MUKANGANYAMA S., UNGELL, A.L., 2006. The potential inhibitory effect of antiparasitic drugs and natural products on P-glycoprotein mediated efflux. *Eur J Pharm Sci*. **29**:70-81.
- HAYNES, R.K., FUGMANN, B., STETTER, J., RIECKMANN, K., HEILMANN, H.D., CHAN, H.W., CHEUNG, M.K., LAM, W.L., WONG, H.N., CROFT, S.L., VIVAS, L., RATTRAY, L., STEWART, L., PETERS, W., ROBINSON, B.L., EDSTEIN, M.D., KOTECKA, B., KYLE, D.E., BECKERMANN, B., GERISCH, M., RADTKE, M., SCHMUCK, G., STEINKE, W., WOLLBORN, U., SCHMEER, K., RÖMER, A., 2006. Artemisone – a new, highly active antimalarial drug of the artemisinin class. *Angewandte Chemie International Edition in English*, Mar; **45**(13):2082-2088.
- HIEN, T.T., WHITE, N.J., 1993. Quinghaosu. *Lancet*, Mar; **341**(8845):603-608.

VII. Referências bibliográficas

- HILL, D.R., BAIRD, J.K., PARISE, M.M., LEWIS, L.S., RYAN, E.T., MAGILL, A.J., 2006. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. *Am.J.Trop. Med. Hyg.*, **75**(3):402-415.
- I.P.C.C., 2007: *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 976pp.
- ITTARAT, W., PICKARD, A.L., RATTANASINGANCHAN, P., WILAIRATANA, P., LOOAREESUWAN, S., EMERY, K., LOW, J., UDOMSANGPETCH, R., MESHNICK, S.R., 2003. Recrudescence in artesunate-treated patients with *falciparum* malaria is dependent on parasite burden not on parasite factors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Feb; **68**(2):147-52.
- IWANARI, M., NAKAJIMA, M., KIZU, R., HAYAKAWA, K., YOKOI, H., 2002. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. *Arch Toxicol*, **76**:287-298.
- JONES, S.A., MOORE, L.B., SHENK, J.L., WISELY, B., HAMILTON, G.A., MCKEE, D., TOMKINSON, N., LECLUYSE, E., LAMBERT, M., WILLSON, T., KLIEWER, S., MOORE, J., 2000. The Pregnane X Receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Molecular Endocrinology*, **14**(1):27-39.
- JARUCHOTIKAMOL, A., JARUKAMJORN, K., SIRISANGTRAKUL, W., SAKUMA, T., KAWASAKI, Y., NEMOTO, N., 2007. Strong synergistic induction of CYP1A1 expression by andrographolide plus typical CYP1A inducers in mouse hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **224**:156-162.
- JULIANO, R.L., LING V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, **455**:152-62.
- KANNO, Y., OTSUKA, S., HIROMASA, T., NAKAHAMA, T., INOUE, Y., 2004. Diurnal difference in CAR mRNA expression. *Nuclear Receptor*, **2**:6.
- KAWASE, A., FUJII, A., NEGORO, M., AKAI, R., ISHIKUBO, M., KOMURA, H., IWAKI, M., 2008. Differences in Cytochrome P450 and Nuclear Receptor mRNA levels in liver and small intestines between SD and DA Rats. *Drug Metab. Pharmacokinet*, **23**(3):196-206.
- KIYOMITO, G.A., HALLIFAX, D., HOUSTON, J.B., 2005. CYP3A4 Substrate Selection and Substitution in the Prediction of Potential Drug-Drug Interactions. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **314**:180-190.
- KIYOSAWA, N., KWEKEL, J.C., BURGOON, L.D., DERE, E., WILLIAMS, K.J., TASHIRO, C., CHITTIM, B., ZACHAREWSKI, T.R., 2008. Species-Specific Regulation of PXR/CAR/ER-Target Genes in the Mouse and Rat Liver Elicited by o,p'-DDT. *BMC Genomics*, **9**:487.
- KLIEWER, S.A., GOODWIN B., WILLSON, T., 2002. The nuclear pregnane x receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrine Reviews*, **23**(5):687-702.

VII. Referências bibliográficas

- KLOSE, T.S., BLAISDELL, J.A., GOLDSTEIN, J.A., 1999. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol*, **13**:289-95.
- KONDRAGANTI, S.R., JIANG, W., 2002. MOORTHY, B., 2002. Differential regulation of expression of hepatic and pulmonary cytochrome P450 1A enzymes by 3-methylcholanthrene in mice lacking the cyp1A2 gene. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **303**:945-951.
- KRASOWSKI, M.D., YASUDA K., HAGEY L.R., SCHUETZ E.G., 2005, Evolutionary selection across the nuclear hormone receptor superfamily with a focus on the NR1I subfamily (vitamin D, pregnane X, and constitutive androstane receptors). *Nuclear Receptor*, **3**:2.
- KREMSNER, P.G., KRISHNA, S., 2004. Antimalarial combinations. *Lancet*, Jul 17; **364** (9430): 285-94.
- KRISHNA, S., UHLEMANN, A.C., HAYNES, R.K., 2004. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Update*, Aug-Oct; **7**(4-5):233-244.
- KROETZ, D.L., PAULI-MAGNUS, C., HODGES, L.M., HUANG, C.C., KAWAMOTO, M., JOHNS, S.J., SRTYKE, D., FERRIN, T.E., DEYOUNG, J., TAYLOR, T., CARLOS, E.J., HERSKOWITZ, I., GIACOMINI, K.M., CLARK, A.G., 2003. Pharmacogenetics of Membrane Transporters Investigators. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics*, **13**:481-94.
- KRUSEKOPF, S., ROOTS, I., KLEEBERG, U., 2003. Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. *European Journal of Pharmacology*, **466**:7– 12.
- LAMBA, J.K., LIN, Y.S., SCHUETZ, E.G., THUMMEL, K.E., 2002. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*, **54**(10):1271-94.
- LANDER, E.S., LINTON, L.M., *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**(6822):860-921.
- LE BRAS, J., DURAND, R., 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, **17**(2):147-153.
- LECLUYSE, E.L., 2001. Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, **134**:283–289.
- LI W., MO W., SHEN D., SUN L., WANG J., LU S., GITSCHIER J.M., ZHOU B., 2005. Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in action of artemisinin. *PLoS Genet.* Sep; **1**(3):e36.18.
- LI, XUE-Q., BJÖRKMAN, A., ANDERSSON, T.B., GUSTAFSSON, L.L., MASIMIREMBWA, C.M., 2003. Identification of human cytochrome P₄₅₀s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from *in vitro* data. *Eur J Clin Pharmacol*, **59**:429-442.
- LI, X.Q., BJORKMAN, A., ANDERSSON, T.B., RIDDERSTROM, M., MASIMIREMBWA, C.M., 2002. Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther*, **300**(2):399-407.

VII. Referências bibliográficas

- LIM, P., ALKER, A.P., KHIM, N., SHAH, N., INCARDONA, S., DOUNG, S., YI, P., BOUTH, D.M., BOUCHIER, C., PUIJALON, O.M., MESHNICK, S.R., WONGSRICHANALAI, C., FANDEUR, T., LE BRAS, J., RINGWALD, P., ARIEY, F., 2009. *Pfmdr1* copy number and artemisinin derivatives combination therapy failure in falciparum malaria in Cambodia. *Malaria Journal* 2009, **8**:11.
- LIU, Y., WANG, J., WEI, Y., ZHANG, H., LIU, Y., DAI J., 2008. Molecular characterization of cytochrome P450 1A and 3A and the effects of perfluorooctanoic acid on their mRNA levels in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) gills. *Aquatic Toxicology*, **88**:183-190.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods*, **25** (4): 402-408.
- MACPHERSON, D.W., GUSHULAK, B.D., MACDONALDA, L., 2007. Health and foreign policy: influences of migration and population mobility. *Bulletin of the World Health Organization*, Mar; **85**(3):200-206.
- MAGLICH J.M., STOLTZ, C.M., GOODWIN, B., HAWKINS-BROWN, D., MOORE, J.T., KLIEWER, S.A., 2002. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol*, **62**(3): 638-46.
- MAGLICH, J.M., PARKS, D.J., MOORE, L.B., COLLINS, J.L., GOODWIN, B., BILLIN, A.N., STOLTZ, C.A., KLIEWER, S.A., LAMBERT, M.H., WILLSON, T.M., MOORE, J.T., 2003. Identification of a novel human Constitutive Androstane Receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(19):17277-17283.
- MARINI, S., NANNELLI, A., SODINI, D., DRAGONI, S., VALOTI, M., LONGO, V., GERVASI, P.G., 2007. Expression, microsomal and mitochondrial activities of cytochrome P450 enzymes in brain regions from control and phenobarbital-treated rabbits. *Life Sciences*, **80**:910-917.
- MARTIGNONI, M., KANTER, R., GROSSI, P., SATURNO, G., BARBARIA, E., MONSHOUWER M., 2006. An in vivo and in vitro comparison of CYP gene induction in mice using liver slices and quantitative RT-PCR. *Toxicology in Vitro*, **20**:125-131.
- MENARD, D., DJALLE, D., MANIRAKIZA, A., YAPOU, F., SIADOUA, V., SANA, S., MATSIKA-CLAQUIN, M.D., NESTOR, M., TALARMIN, A., 2005. Drug-resistant malaria in Bangui, Central African Republic: an in vitro assessment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Aug; **73**(2):239-243.
- MENEZES CM, KIRCHGATTER K, DI SANTI SM, PAULA GA, FERREIRA EI. 2001. *In vitro* evaluation of quinidine sensitivity in Brazilian *Plasmodium falciparum* isolates: comparative analysis to quinine and chloroquine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, Jul- Aug, **43** (4): 221-6.
- MESHNICK, S.R., 2002. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal of Parasitology*, Dec; **32**(13):1655-1660.

VII. Referências bibliográficas

- MOLTA, N.B., OGUCHE, S., PAM, S.D., OMALU, I.C., AFOLABI, B.M., ODUJOKO, J.B., AMAJOH, C.N., ADENIJI, B., WUYEP, V.P., EKANEM, O.J., 2003. Amodiaquine treatment of uncomplicated malaria in children, in an area of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in northcentral Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Oct; **97** (7): 663-9.
- MOORE, L.B., MAGLICH, J.M., MCKEE, D.D., WISELY, B., WILLSON, T.M., KLIEWER, S.A., LAMBERT, M.H., MOORE, J.T., 2002. Pregnane X Receptor (PXR), Constitutive Androstane Receptor (CAR), and Benzoate X Receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Molecular Endocrinology*, **16**(5):977-986.
- MURAKAMI, Y., HIGASHI, Y., MATSUNAGA, N., KOYANAGI, S., OHDO, S., 2008. Circadian clock-controlled intestinal expression of the multidrug-resistance gene *mdr1a* in mice. *Gastroenterology*, **135**: 1636-1644.
- NISHIZAWA, H., IMANISHI, S., MANABE, N., 2005. Effects of exposure in utero to bisphenol A on the expression of Aryl Hydrocarbon Receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, **52**(5).
- NOEDL H, WERNSDORFER WH, MILLER RS, WONGSRICHANALAI C. 2002. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother*. Jun; **46**(6):1658-64.
- NOEDL H, SE Y, SCHAECHER K, SMITH BL, SOCHEAT D, FUKUDA MM, 2008. Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med.*, **359**:2619-20.
- NOEL, S., SHARMA, S., SHANKER, R., RATH, S., 2007. Primaquine-induced differential gene expression analysis in mice liver using DNA microarrays. *Toxicology*, **239**:96-107.
- OLINGA, P., ELFERINK, M.G.L., DRAAISMA, A.L., MEREMA, M.T., CASTELL, J.V., PÉREZ, G., GROOTHUIS, G.M.M., 2008. Coordinated induction of drug transporters and phase I and II metabolism in human liver slices. *European journal of pharmaceutical sciences*, **33**:380-389.
- OLIVER, M., SIMON, F., MONBRISON, F., BEAVOGUI, A.H., PRADINES, B., RAGOT, C., MOALIC, J.L., RAPP, C., PICOT, S., 2008. Le nouvel âge de la primaquine contre le paludisme. *Médecine et maladies infectieuses*, **38**:169-179.
- OLLIARO P., MUSSANO P., 2003. Amodiaquine for treating malaria. *Cochrane Database Syst Rev.*; (2) CD000016.
- OLLIARO, P.L., TAYLOR, W.R. 2004. Developing artemisinin based drug combinations for the treatment of drug resistant *falciparum* malaria: A review. *Journal of Postgraduate Medicine*, Jan-Mar; **50**(1):40-4.
- OMS- World Malaria Report 2008.

VII. Referências bibliográficas

- PASCUSSI, J.M., GERBAL-CHALOIN, S., DROCOURT, L., MAUREL, P., VILAREM, M.J., 2003. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1619**:243– 253
- PAYNE, D. 1988. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bulletin of the World Health Organization*, **66** (5): 621-6.
- PERALLA, M.A., PARIKH, C., 2005. Pharmacology. *Am. J. Kidney Dis*, **46**:1129-39.
- PETERS, W., STEWART, L.B., ROBINSON, B.L., 2003. The chemotherapy of rodent malaria. LXI. Drug combinations to impede the selection of drug resistance, part 4: the potential role of 8-aminoquinolines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **97** (3): 221-236.
- PFAFFL, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29** (9):45.
- PHAM, Y.T., REGINA, A., FARINOTTI, R., COURAUD, P., WAINER, I.W., ROUX, F., GIMENEZ, F., 2000. Interactions of racemic mefloquine and its enantiomers with P-glycoprotein in an immortalised rat brain capillary endothelial cell line. *Biochim Biophys Acta*, **1524**:212-9.
- PHAN, V.T. 2002. Artemisinin and artesunate in the treatment of malaria in Vietnam (1984- 1999). *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, Jun; **95**(2):86-8.
- PILLAI, D.R., HIJAR, G., MONTOYA, Y., MAROUINO, W., RUEBUSH, T.K., WONGSRICHANALAI, C., KAIN, K.C., 2003. Lack of prediction of mefloquine and mefloquine-artesunate treatment outcome by mutations in the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 (*pfmdr1*) gene for *P. falciparum* malaria in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Jan; **68** (1): 107-10.
- PRAYGOD, G., FREY, A., EISENHUT, M., 2008. Artemisinin derivatives versus quinine in treating severe malaria in children: a systematic review. *Malaria Journal*, **7**:210.
- PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A., 1993. *Microbiology*, (2nd Edition), Wm. C. Brown Communications, Inc USA.
- PRICE, R.N., NOSTEN, F., 2001. Drug resistant *falciparum* malaria: clinical consequences and strategies for prevention. *Drug Resistance Update*, Jun; **4** (3): 187-96.
- PROJEAN, D., BAUNE, B., *et al.*, 2003. In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4 and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metab Dispos*, **31**(6):748-54.
- REED, M.B., SALIBA, K.J., CARUANA, S.R., KIRK, K., COWMAN, A.F. 2000. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. Feb 24; **403** (6772):906-9.
- REY, L., 2001. Parasitologia, 3^a Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- RIBEIRO, V., CAVACO, I., 2006. Pharmacogenetics of cytochrome P450 in tropical medicine. *Current Drug Targets*, **7**(12): 1709-19.

- ROBERT, A., BENOIT-VICAL, F., DECHY-CABARET, O., MEUNIER, B., 2001. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. *Pure and Applied Chemistry*, **73**(7): 1173-1188.
- SCHOCH, G.A., YANO, J.K., WESTER, M.R., GRIFFIN, K.J., STOUT, C.D., JOHNSON, E.F., 2004. Structure of microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. *J Bio Chem*, 279:9497-503.
- SCHWOBEL, B., JORDAN, S., VANISAVETH, V., PHETSOUVANH, R., CHRISTOPHEL, E.M., PHOMPIDA, S., VON SONNENBURG, F., JELINEK, T., 2003. Therapeutic efficacy of chloroquine plus sulphadoxine/ pyrimethamine compared with monotherapy with either chloroquine or sulphadoxine/ pyrimethamine in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Laos. *Tropical Medicine and International Health*, Jan; **8** (1): 19-24.
- SHAH NK, ALKER AP, SEM R, SUSANTI AI, MUTH S, MAGUIRE JD, DUONG S, ARIEY F, MESHNICK SR, WONGSRICHANALAI C., 2008. Molecular surveillance for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*, Cambodia. *Emerg Infect Dis.*, **14**: 1637-40.
- SHAKOOR, O., TAYLOR, R.B., BEHRENS, R.H., 1997. Assessment of the incidence of substandard drugs in developing countries. *Tropical Medicine and International Health*, Sep; **2** (9):839-45.
- SHEKALAGHE, S., DRAKELEY, C., GOSLING, R., NDARO, A., MEEGEREN, M., ENEVOLD, A., AILFRANGIS, M., MOSHA, F., SAURWEIN, R., BOUSEMA, T., 2007. Primaquine clears submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocytes that persist after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine and artesunate. *PLoS ONE*, **2**(10):e1023.
- SOLYMOSY, F., FEDORCSÁK, I., EHRENBERG, L., 1968. A new method based on the use of diethylpirocarbonate as a nuclease inhibitor for the extraction of undergraded nucleic acid from plant tissues. *European Journal of Biochemistry*, **5**: 520-527.
- SUTANTO, I., SUPRIYANTO, S., RUCKERT, P., PURNOMO, MAGUIRE, J.D., BANGS, M.J., 2004. Comparative efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and impact on gametocyte carriage rates in the East Nusatenggara province of Indonesia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **70** (5): 467-73.
- SZAKACS, G., PATERSON, J.K., LUDWIG, J.A., BOOTH-GENTHE, C., GOTTESMAN, M.M., 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **5**:219-34.
- TAKANO, M., YUMOTO, R., MURAKAMI, t., 2006. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacology & Therapeutics*, **109**: 137-161.
- TALISUNA, A.O., NALUNKUMA-KAZIBWE, A., BAKYAITA, N., LANGI, P., MUTABINGWA, T.K., WATKINS, W.W., VAN MARCK, E., D'ALESSANDRO, U., EGWANG, T.G., 2004. Efficacy of sulphadoxinepyrimethamine alone or combined with amodiaquine or chloroquine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Ugandan children. *Tropical Medicine and International Health*, Feb; **9** (2): 222-9.

- TIRONA, R.G., KIM, R.B., 2005. Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J Pharm Sci*, **74**:397-411.
- TROTTA, R.F., BROWN, M.L., TERRELL, J.C., GEYER, J.A., 2004. Defective DNA repair as a potential mechanism for the rapid development of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*, May 4; **43** (17):4885-91.
- UEDA, A., HAMADEH, H.K., WEBB, H.K., YAMAMOTO, Y., SUEYOSHI, T., AFSHARI, C.A., LEHMANN, NEGISHI, M., 2002. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol Pharmacol*, **61**:1-6.
- VALE, N., MATOS, J., GUT, J., NOGUEIRA, F., ROSARIO V., ROSENTHAL, P., MOREIRA R., GOMES P., 2008. Imidazolidin-4-one peptidomimetic derivatives of primaquine: Synthesis and antimalarial activity. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*.
- VAN GEERTRUYDEN, J., MENTEN J., COLEBUNDERS R., KORENROMP E., D'ALESSANDRO U., 2008. The impact of HIV-1 on the malaria parasite biomass in adults in sub-Saharan Africa contributes to the emergence of antimalarial drug resistance, *Malaria Journal*.
- VENNERSTROM, J.L., AGER, A.L. JR., ANDERSEN, S.L., GRACE, J.M., WONGPANICH, V., ANGERHOFER, C.K., HU, J.K., WESCHE, D.L., 2000. Assessment of the antimalarial potential of tetraoxane WR 148999. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, May; **62** (5):573-8.
- VENTER, JC., ADAMAS, MD., *et al.* 2001. The sequence of the human genome. *Science*, **291**(5507):1304-51.
- VIVAS, L., RATTRAY, L., STEWART, L.B., ROBINSON, B.L., FUGMANN, B., HAYNES, R.K., PETERS, W., CROFT, S.L., 2007. Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semisynthetic endoperoxide artemisone in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Apr; **59**(4):658-665.
- WERNSDORFER, W.H., PAYNE, D., 1991. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacology and Therapeutics*, **50** (1):95-121.
- WERNSDORFER, W.H., 1994. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica*, Mar; **56** (2-3):143-56.
- WHITE, N.J., 2004. Antimalarial drug resistance. *Journal of Clinical Investigation*, Apr; **113**(8):1084-92.
- WONGSRICHANALAI, C., PICKARD, A.L., WERNSDORFER, W.H., MESHNICK, S.R., 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infectious Diseases*, Apr; **2** (4): 209-18.
- WOODLAND, C., HUANG, T.T., GRYZ, E., BENDAYAN, R., FAWCETT, J.P., 2008. Expression, activity and regulation of Cyp3A in human and rodent brain. *Drug Metabolism Reviews*, **40**:149-168.
- WERCK-REICHHART, D., FEYEREISEN, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, **1**(6):reviews3003.1-3003.9.

VII. Referências bibliográficas

WHITE, N.J., 2004. Antimalarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, Apr; **113**(4):1084-1092.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001a. Antimalarial drugs combination therapy. Report of a WHO Technical Consultation WHO/CDS/RBM/2001.35. Geneva: WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001b. The use of antimalarial drugs. Report of an Informal Consultation. WHO/CDS/RBM/2001.33. Geneva: WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2005a. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring: 1996-2004. WHO/HTM/MAL/2005.1103. Geneva: WHO.

World Health Organization. 2005 b. World Malaria Report 2005. WHO/HTM/MAL/2005.1102. Geneva: WHO.

World Health Organization. 2006 a. Malaria vector control and personal protection: report of a WHO study group. WHO technical report series, **936**. Geneva: WHO.

World Health Organization. 2006 b. WHO briefing on *Malaria Treatment Guidelines* and artemisinin monotherapies. Geneva: WHO.

World Health Organization. 2006 c. WHO guidelines for the treatment of malaria. HTM/MAL/2006.1108. Geneva: WHO.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the treatment of malaria. 2006.

YADAV, S., DHAWAN, A., SETH, P.K., SINGH, R.L., PARMAR, D., 2006. Cytochrome P4503A: Evidence for mRNA expression and catalytic activity in rat brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **287**:91–99.

YAMADA, H., MATSUNAGA, H., TSUJI, K., MATSUMOTO, S., YAMAMOTO, M., ISHII, Y., OMIECINSKI, C.J., OGURI, K., 2000. Sequence Analyses of *CYP2B* Genes and Catalytic Profiles for P450s in QdJ:Sprague-Dawley Rats That Lack Response to the Phenobarbital-Mediated Induction of CYP2B21. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **295**:986–993.

YAMAMOTO, Y., KAWAMOTO, T., NEGISHI M., 2002. The role of the nuclear receptor CAR as a coordinate regulator of hepatic gene expression in defense against chemical toxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **409**:207–211.

<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>

<http://www.arikah.net/enciclopedia-portuguese/Mal%C3%A1ria>

www.cdc.gov/.../artesunate_now_available.htm

www.freepatentsonline.com/6750356.html

<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/SYBRGreen.htm>

<http://trishul.sci.gu.edu.au/tools/OligoCalculator.html>

<http://www.malariasite.com/MALARIA>

<http://www.mib.ac.uk/images/Staff/leys3.jpg>

VII. Referências bibliográficas

www.nature.com/.../v8/n7/fig_tab/nrg2126_F1.htm
<http://www.psiquiatria.org.br/tratamento/imagens/interacoes.jpg>
<http://www.rain-tree.com/quinine.htm>
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>

VIII. Anexos

Anexo I – Valores de expressão dos excipientes dos fármacos Artemisinina e Primaquina

Genes codificantes de reguladores de transcrição CAR e PXR

Fígado

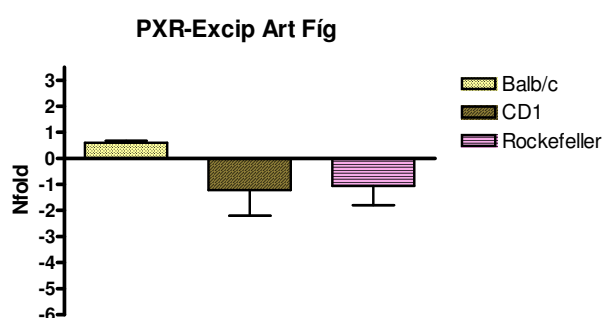


Fig. VIII.1 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a PXR no fígado (Excip-excipiente; Art-artemisinina; Fíg-fígado)

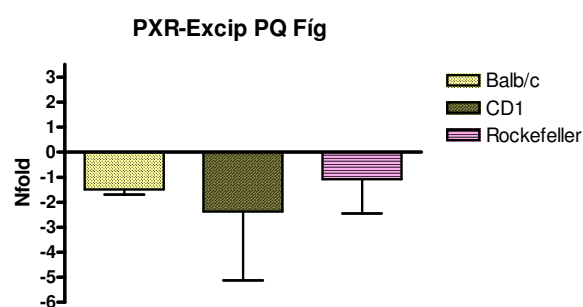


Fig. VIII.2 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a PXR no fígado (Excip-excipiente; PQ-primaquina; Fíg-fígado)

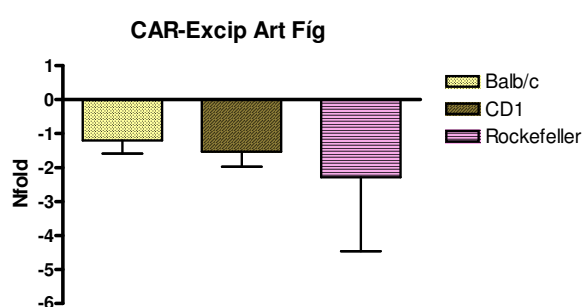


Fig. VIII.3 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a CAR no fígado (Excip-excipiente; Art-artemisinina; Fíg-fígado)

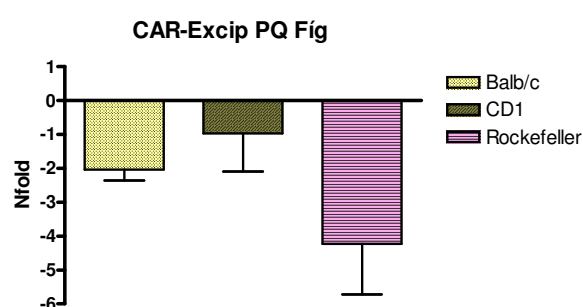


Fig. VIII.4 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a CAR no fígado (Excip-excipiente; PQ-primaquina; Fíg-fígado)

• Intestino

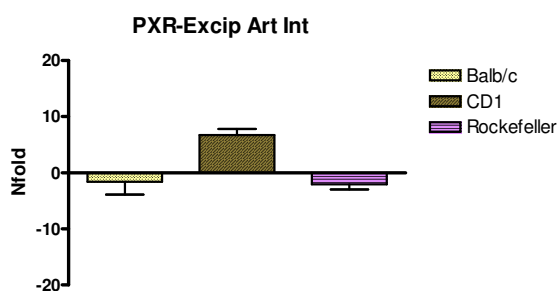


Fig.VIII.5 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a PXR no intestino (Excip-excipiente; Art-artemisinina; Int-intestino)

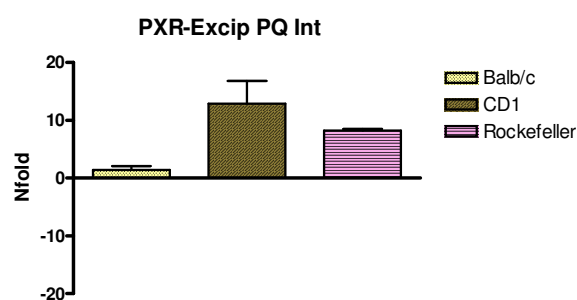


Fig.VIII.6 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a PXR no intestino (Excip-excipiente; PQ-primaquina; Int-intestino)

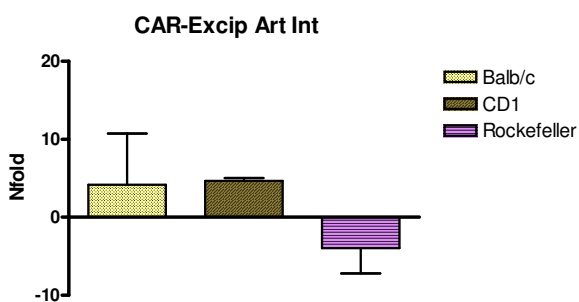


Fig. VIII.7 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a CAR no intestino (Excip-excipiente; Art-artemisinina; Int-intestino)

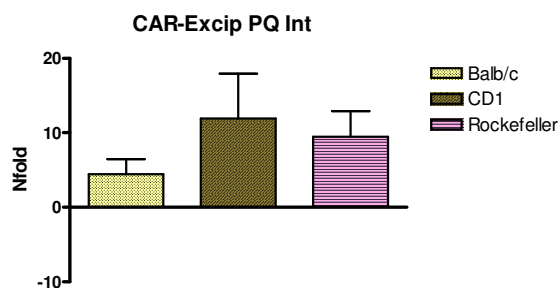


Fig. VIII.8 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a CAR no intestino (Excip-excipiente; PQ-primaquina; Int-intestino)

▪ Genes codificantes de transportadores *mdr1a* e *mdr1b*

• Fígado

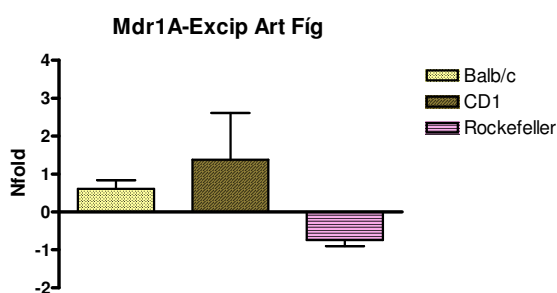


Fig. VIII.9 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a *mdr1a* no fígado (Excip-excipiente; Art-artemisinina; Fíg-fígado)

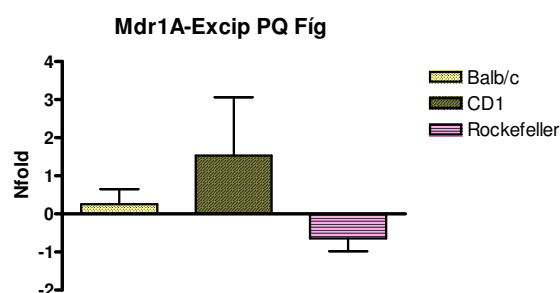


Fig. VIII.10 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a *mdr1a* no fígado (Excip-excipiente; PQ-primaquina; Fíg-fígado)

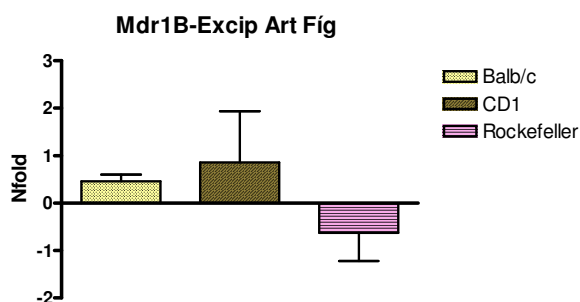


Fig. VIII.11 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a *mdr1b* no fígado (Excip-excipiente; Art-artemisinina; Fíg-fígado)

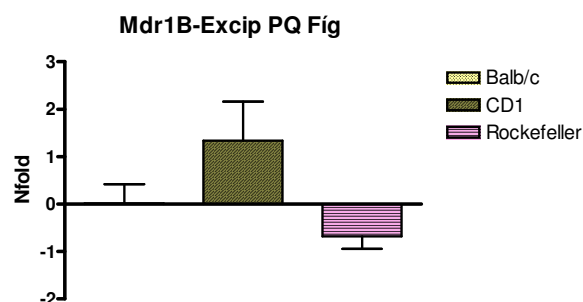


Fig. VIII.12 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a *mdr1b* no fígado (Excip-excipiente; PQ-primaquina; Fíg-fígado)

• Intestino

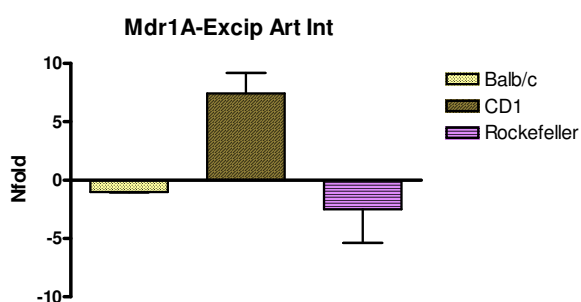


Fig. VIII.13 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a *mdr1a* no intestino (Excip-excipiente; Art-artemisinina; Int-intestino)

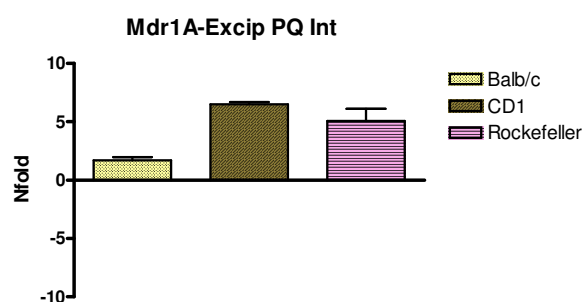


Fig. VIII.14 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a *mdr1a* no intestino (Excip-excipiente; PQ-primaquina; Int-intestino)

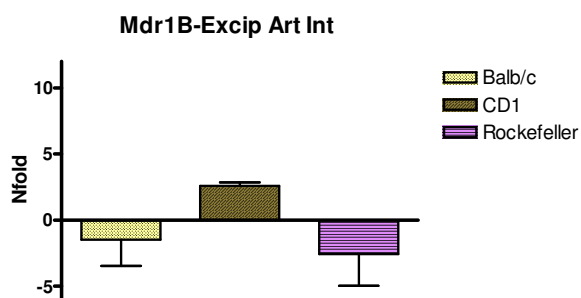


Fig. VIII.15 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a *mdr1b* no intestino (Excip-excipiente; Art-artemisinina; Int-intestino)

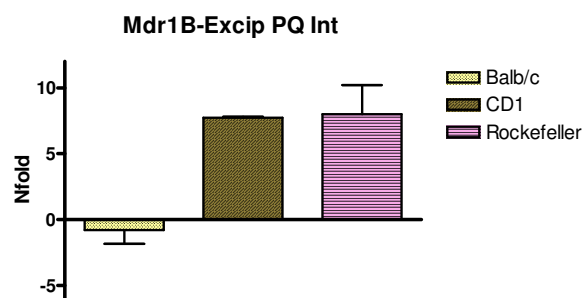


Fig. VIII.16 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a *mdr1b* no intestino (Excip-excipiente; PQ-primaquina; Int-intestino)

- Genes codificantes de citocromos das sub-famílias CYP1A, 2B, 2C e 3A

- Fígado

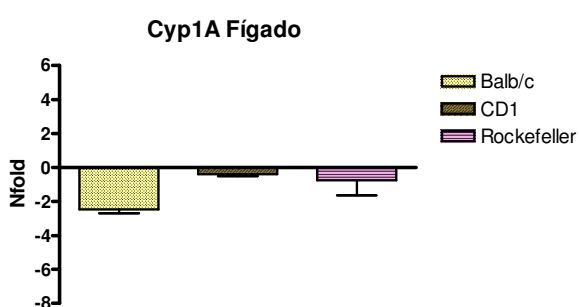


Fig. VIII.17 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a Cyp1A no fígado

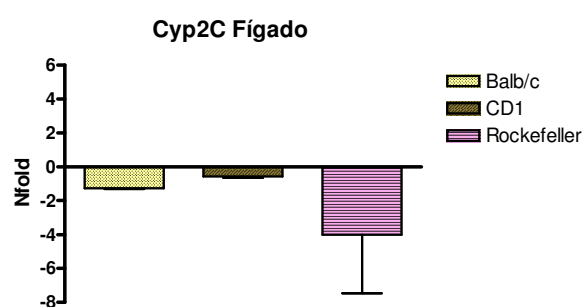


Fig. VIII.19 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a Cyp2C no fígado

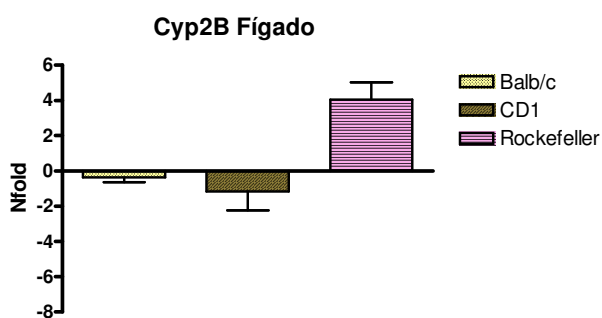


Fig. VIII.18 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a Cyp2B no fígado

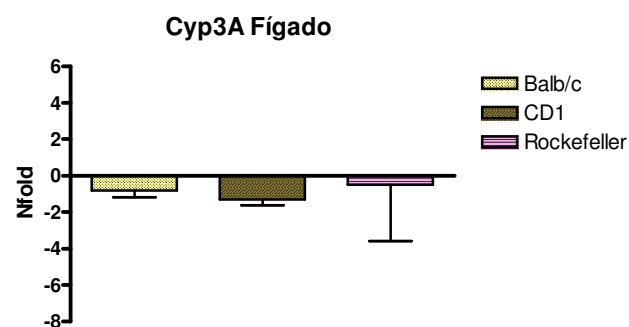


Fig. VIII.20 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a Cyp3A no fígado

• Intestino

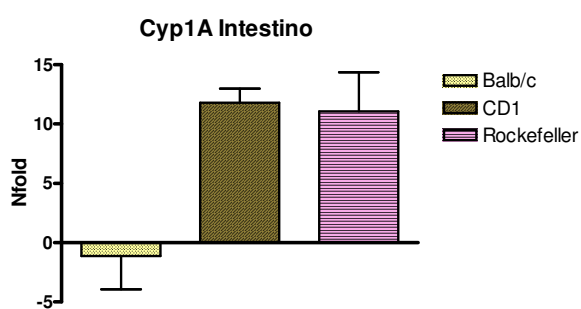


Fig.VIII. 21 – Valores de expressão do excipiente de Primaquina associado a Cyp1A no intestino

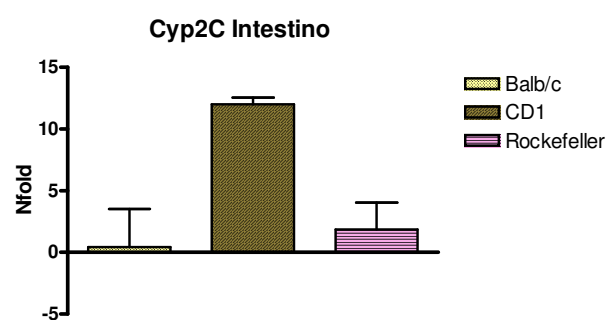


Fig. VIII.22 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a Cyp2C no intestino

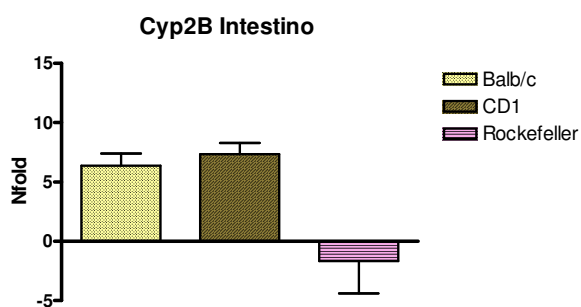


Fig. VIII.23 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a Cyp2B no intestino

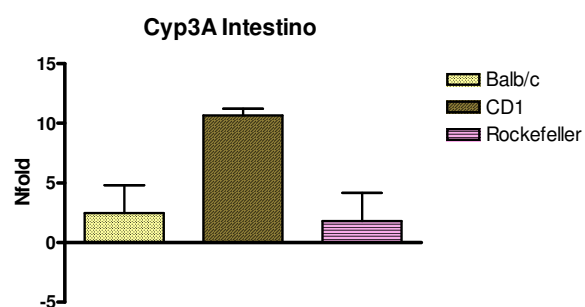


Fig. VIII.24 – Valores de expressão do excipiente de Artemisinina associado a Cyp3A no intestino

Anexo II – Alinhamento de primers da subfamília Cyp1A

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1A1	ATGCCCTCCATGTATGGACTTCCAG-CCTTCGTGTCAGGCCACAGAGCTGCTCCTGGCTGTCACCGTATTCTGCTTGGATTCTGGGTGGTCAGAGCCACA										
1A2	ATG-GCGTTCTCCAGTACATCTCCTTAGCCCAAGAGCTGCTACTGGCCACTGCCATCTTCTGTTTATGTTCTGGATGGTCAGAGCCCTCA										
CYP1AF											
CYP1AR											
Consensus										
	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1A1	AGAACCTGGGTTCCCAAGGCCCTGAGAGCTCCACCAGGGCCCTGGGGCTTGCCCTTCATTGGTCACATGCTGACTGTGGGGAGAGACCCACATCTGTACAC										
1A2	AGGACCCAGGTTCCCAAGGCCCTGAGAGATCCACCCGGACCCCTGGGGCTTGCCCTTCATTGGGCACATGCTGACTGTGGGGAGAGACCCACATCTGTACAC										
CYP1AF											
CYP1AR											
Consensus										
	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
1A1	TGACACGGCTGAGTCAGCAGTATGGGACGTGCTGCAGATCCGCATCGGCTCCACTCCTGTGTTGGTGGTGTGAGCGGGCTGAGCACCATCAGCAGGCCCT										
1A2	TGACACGGCTGAGTCAGCAGTATGGGACGTGCTGCAGATCCGCATCGGCTCCACTCCTGTGTTGGTGGTGTGAGCGGGCTGAGCACCATCAGCAGGCCCT										
CYP1AF	TATGGGGACGTGCTGCAGATCCGC										
CYP1AR											
Consensust.atggggacgtgctgcagatccgc.....										
	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
1A1	GGTGAGGCAGGGAGATGACTTCAAGGGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCACACTTATCACTAATGGCAGAGCATGACTTTTACCCAGACTCTGGACCC										
1A2	GGTGAGGCAGGGAGATGACTTCAAGGGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCACACTTATCACTAATGGCAGAGCATGACTTTTACCCAGACTCTGGACCC										
CYP1AF	GGTGAGGCAGGGAGATGACTTCAAG										
CYP1AR	ggcagggcagggagatgacttcaa										
Consensus										
	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
1A1	GTGTGGGCTGCCCGCCGGCGCTTGGCCAGAGTGCCTGAGAGGCTTCTCCATAGCCTCGGACCCGACGTACGATCCTCTTGTACTTTGGAGGAGCACG										
1A2	GTGTGGGCTGCCCGCCGGCGCTTGGCCAGGATGCCTGAGAGGCTTCTCCATAGCCTCGGACCCGACGTACGATCCTCTTGTACTTTGGAGGAGCACG										
CYP1AF											
CYP1AR											
Consensus										
	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
1A1	TGAGCAGGGAGGCTAATCTATCTCGTCAGCAACTTCAGAGGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTTGACCTTACAGATATTTGGTCGTGTCAGTAGCCAA										
1A2	TGAGCAGGGAGGCTAATCTATCTCGTCAGCAACTTCAGAGGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTTGACCTTACAGATATTTGGTCGTGTCAGTAGCCAA										
CYP1AF											
CYP1AR											

Primers

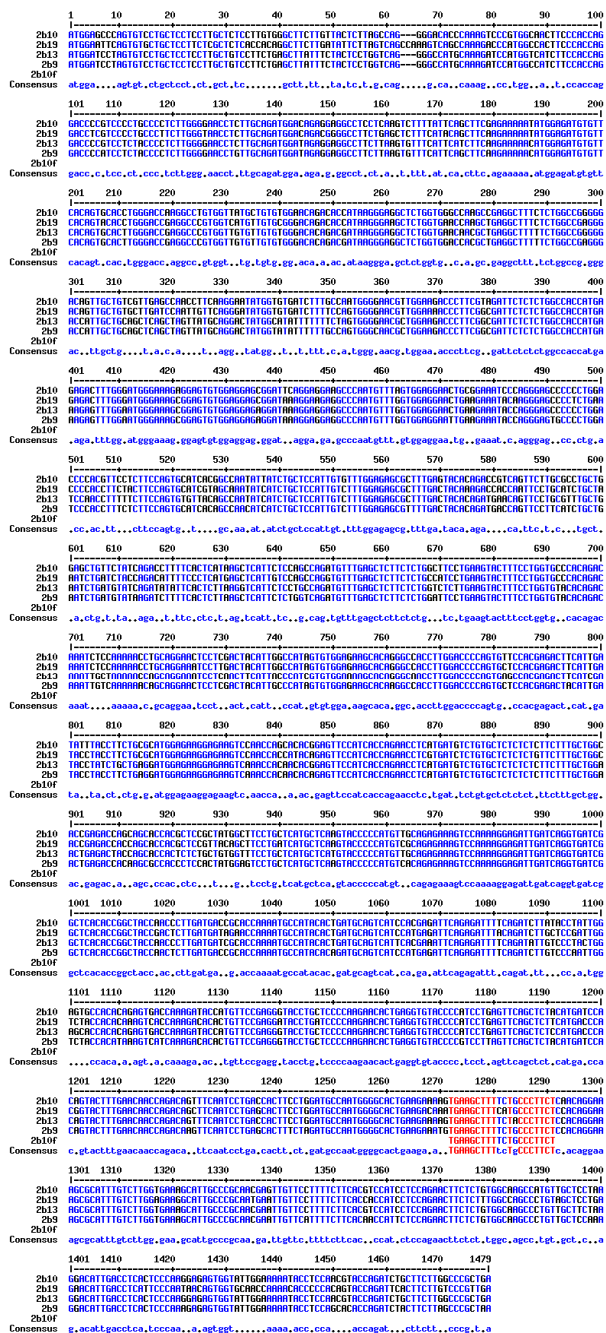
>CYP1AF

TATGGGGACGTGCTGCAGATCC

>CYP1AR

GGTGAGGCAGGGAGATGACTTCAA

Anexo III – Alinhamento de primers da subfamília Cyp2B



Primers

>CYP2BF

AAGAACACTGAGGTGTACCCC

<CYP2BR

TCTTCAGTGCCCCATTGGC

Anexo IV– Alinhamento de primers da subfamília Cyp2C

	1201	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
2C54	GATGCAAGGAGTTCCCAACCCAGAGAGTTTGACCCCTGGGCACATTTCTAGATGAGATGGAAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C37	GACGCAAGGAGTTCCCAACCCAGAGAGTTTGACCCCTGGGCACATTTCTAGATGAGATGGAAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C50	GATGCAAGGAGTTCCCAACCCAGAGAGTTTGACCCCTGGGCACATTTCTAGATGAGAGAGGAAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C29	GACGCAAGGAGTTCCCAACCCAGAGAGTTTGACCCCTGGGCACATTTCTAAGATGGGATGGAAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C39	GACGCAAGGAGTTCCCAACCCAGAGAGTTTGTTTGACCCCTGGGCACATTTCTAGATGCTATGGAAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C38	GACGCAAGGAGTTCCCAACCCAGAGAGTTTGTTTGACCCCTGGGCACATTTCTAGAGCTCATTTGAAAGATTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C40	GACGCAAGGAGTTCCCAACCCAGAGAGTTTGACCCCTGGGCACATTTCTAGATGACATTTGAAAGATTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C55	GATGCAAGGAGTTTCCCAACCCAGAGAGTTTGATCTTACTTCTTCTGGATGAGATGGCAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C65	GATGATTAAGAGATTCCCAACCCAGAGAGTTTGATCTTACTTCTTCTGGATGAGAGTGGCAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C66	GATGATTAAGAGATTCCCAACCCAGAGAGTTTGATCTTACTTCTTCTGGATGAGAGTGGCAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C70	GATGCAAGGAGTTTCCCAACCCAGAGAGTTTGATCTTACTTCTTCTGGATGAGAGTGGCAAGTTTAAAAAAGTGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C44	GATCAAAAGGAGTTTCCCAACCCAGAGAGTTTGATCTTACTTCTTCTGGATGAGAGTGGCTGCTCTCAAAAGATGACTACTTCATGCCATTCTCAA										
2C53											
CYP2CF	AACCCAGAGATGTTTGACCCCTGGGC										
CYP2CR	AACCCAGAGATGTTTGACCCCTGGGC										
Consensus	AACCCAGAGATGTTTGACCCCTGGGC										
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
2C54	CAGGGAACCGGATATGTGACGAGAGGGGCTGGCACGATGGAGCTGTTCTCTGTTCTTACACGACATTTTACAGAGCTTCACCTGAAACCTCTGGTTCA										
2C37	CAGGGAACCGGATATGTGACGAGAGGGGCTGGCACGATGGAGCTGTTCTCTGTTCTTACACGACATTTTACAGAGCTTCACCTGAAACCTCTGGTTCA										
2C50	CAGGGAACCGGATATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCCGCGATGGAGCTGTTCTCTGTTCTTACACGACATTTTACAGAGCTTCACCTGAAACCTCTGGTTCA										
2C29	CAGGGAACCGGATATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCCGCGATGGAGCTGTTCTCTGTTCTTACACGACATTTTACAGAGCTTCACCTGAAATCTCTGGTTCA										
2C39	CAGGGAACCGGATATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCCGCGATGGAGCTGTTCTCTGTTCTTACACGACATTTTACAGAGCTTCACCTGAAACCTCTGGTTCA										
2C38	CAGGGAACCGGATATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCCGCGATGGAGCTGTTCTCTGTTCTTACACGACATTTTACAGAGCTTCACCTGAAATCTCTGGTTCA										
2C40	CAGGGAACCGGATATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCCGCGATGGAGCTGTTCTCTGTTCTTACACGACATTTTACAGAGCTTCACCTGAAACCTCTGGTTCA										
2C55	TAGGAAGCGAATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCTGGACGAGGCTGTTTCTGATTCTGACACCATTTTACAGAGCTTCACCTGAAATCTCTGGTTCA										
2C65	CAGGGAACCGGATATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCTGGACGAGGCTGTTTCTGATTCTGACACCATTTTACAGAGCTTCACCTGAAATCTCTGGTTCA										
2C66	CAGGGAACCGGATATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCTGGACGAGGCTGTTTCTGATTCTGACACCATTTTACAGAGCTTCACCTGAAATCTCTGGTTCA										
2C70	CAGGGAACCGGATATGTGCTGGAGAGGGGCTGGCTGGACGAGGCTGTTTCTGATTCTGACACCATTTTACAGAGCTTCACCTGAAATCTCTGGTTCA										
2C44	TCGGGAGGCGATCTCTGTTGCTGGAGAGGGGCTGGCCGCGATGGAGCTGTTCTCTGTTCTTACACCATTTCTGCAAAATTTTCCCTAAGGCTCTGGTTGA										
2C53											
CYP2CF	CTGGCCGCGATGGAGCTGTTT										
CYP2CR	CTGGCCGCGATGGAGCTGTTT										
Consensus	CTGGCCGCGATGGAGCTGTTT										
	1401	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1489	
2C54	CCCAAGGACATAGATATACCCCAATGCTCATTTGGATTGGGCTCAGTGCCCTCTGCTTTCCAGCTCTGCTTCATTCTCTCTGA										
2C37	CCCAAGGACATAGATATACCCCAATGCTCATTTGGATTGGGCTCAGTGCCCTCTGCTTTCCAGCTCTGCTTCATTCTCTCTGA										
2C50	CCCAAGGACATAGATATACCCCAATGCTCATTTGGATTGGGCTCAGTGCCCTCTGCTTTCCAGCTCTGCTTCATTCTCTCTGA										
2C29	CCCAAGGACATAGATATACCCCAATGCTCATTTGGATTGGGCTCAGTGCCCTCTGCTTTCCAGCTCTGCTTCATTCTCTCTGA										
2C39	CCCAAGGACATAGATATACCCCAATGCTCATTTGGATTGGGCTCAGTGCCCTCTGCTTTCCAGCTCTGCTTCATTCTCTCTGA										
2C38	CCCAAGGACATAGATATACCCCAATGCTCATTTGGATTGGGCTCAGTGCCCTCTGCTTTCCAGCTCTGCTTCATTCTCTCTGA										
2C40	CCCAAGGACATAGATATACCCCAATGCTCATTTGGATTGGGCTCAGTGCCCTCTGCTTTCCAGCTCTGCTTCATTCTCTCTGA										
2C55	TACCAAGGACATGACACTACTCCAGTGCCCAATGCTTTTGGCCGCTGACACCTTTCATACAGCTGACTTCATTCTCTCTGA										
2C65	TCTAAGAGCTTGTATACACTACTCCAGTGCCCAATGCTTTTGGCCGCTGACACCTTTCATACAGCTGACTTCATTCTCTCTGA										
2C66	TCTAAGAGCTTGTATACACTACTCCAGTGCCCAATGCTTTTGGCCGCTGACACCTTTCATACAGCTGACTTCATTCTCTCTGA										
2C70	ACCAAGGACATGACACTACTCCAGTGCCCAATGCTTTTGGCCGCTGACACCTTTCATACAGCTGACTTCATTCTCTCTGA										
2C44	GCCAAAGGACCTTGTATCAGGCTGTTACTACTGGGCTTTTCAATCTGCGCCGCTTACAGCTGCGCTTGTTCAGATAG										
2C53											
CYP2CF	CTGGCCGCGATGGAGCTGTTT										
CYP2CR	CTGGCCGCGATGGAGCTGTTT										
Consensus	CTGGCCGCGATGGAGCTGTTT										

Primers

>CYP2CF

AACCCAGAGATGTTTGACCCCTGGGC

>CYP2CR

CTGGCCCGCATGGAGCTGTTT

Anexo V– Alinhamento de primers da subfamília Cyp3A

CYP3AR	
Consensus
	1201 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
3A11	GCTCTTCACCATGACCCACAGCACTGGTCAGAGCCTGAAGGATTCARACCTGAAAGGTTTCAGCAGGAGACAGGGCAGCATTGATCCTTATGTATATC
3A41A	GCTCTTCACCATGACCCACAGCACTGGCCAGAGCCTGAAGGATTCARACCTGAAAGGTTTCAGCAGGAGACAGGGCAGCATTGATCCTTATTTATATA
3A44	GCTCTTCACCATGACCCACAGCACTGGCCAGAGCCTGAAGGATTCARACCTGAAAGGTTTCAGCAGGAGACAGGGCAGCATTGATCCTTACGTATATC
3A16	GCTCTTCACCATGACCCACAGCACTGGCCAGAGCCTGAAGGATTCARACCTGAAAGGTTTCAGCAGGAGACAGGGCAGCATTGATCCTTATGTATATC
3A13	GCTCTTCACAGAGCCACAGTACTGGCCAGAGCCTGAAGGATTCGCCCTGAAAGGTTTCAGCAGGAGACAGGGCAGCATTGATCCTTACATGTATCC
3A25	CCTCTTCACCGAATCCTGAGTACTGGCCAGAGCCTCAGGATTCGCCCTGAAAGGTTTCAGCAGGAGACAGGGCAGCATTGATCCTATATATACA
CYP3AF	AAAGGTTTCAGCAGGAGACAGGG
CYP3AR
Consensusaaaggttcagcaaggagaacaagg.....
	1301 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
3A11	TGCCCTTTGGGAATGGACCCAGGAACTGCTTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAATATGAACCTTGCTCTCACTAAATTTATGCAGAACTTCTCCTTCCA
3A41A	TGCCCTTTGGGAATGGACCCAGGAACTGCTTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAATATGAACCTTGCTCTCACTAAATTTATGCAGAACTTCTCCTTCCA
3A44	TGCCCTTTGGGAATGGACCCAGGAACTGCTTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAATATGAACCTTGCTCTCACTAAATTTATGCAGAACTTCTCCTTCCA
3A16	TGCCCTTTGGGAATGGACCCAGGAACTGCTTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAATATGAACCTTGCTCTCACTAAATTTATGCAGAACTTCTCCTTCCA
3A13	TGCCCTTTGGGAGTGGACCCAGGAACTGCTTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAATATGAACCTTGCTCTCACTAAATTTATGCAGAACTTCTCCTTCCA
3A25	TGCCCTTTGGGAATGGACCCAGGAACTGCTTGGCATGAGGTTTGCTCTCATGAATATGAACCTTGCTCTCACTAAATTTATGCAGAACTTCTCCTTCCA
CYP3AF	GGAACTGCC TTGGCATGAGGTTT
CYP3AR
Consensusggaactgc.ttggcatgaggttt.....
	1401 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
3A11	GCCTTGTAAGGAACACAGATACCTCTGAATTTAGCAGACAGGACTTCTTCAACCGAAGAAACCCATTGTTCTAAGGTTTGCCACGGGATGCAGTC
3A41A	GCCTTGTAAGGAACACAGATACCTCTGAATTTAGCAGACAGGACTTCTTCAACCGAAGAAACCCATTGTTCTAAGGTTTGCCACGGGATGTAGTT
3A44	GCCTTGTAAGGAACACAGATACCTCTGAATTTAGCAGACAGGACTTCTTCAACCGAAGAAACCCATTGTTCTAAGGTTTGCCACGGGATGCAGTT
3A16	GCCTTGTAAGGAACACAGATACCTCTGAATTTAGCAGACAGGACTTCTTCAACCGAAGAAACCCATTGTTCTAAGGTTTGCCACGGGATGCAGTC
3A13	GCCTTGTAAGGAACACAGATACCTCTGAATTTAGCAGACAGGACTTCTTCAACCGAAGAAACCCATTGTTCTAAGGTTTGCCACGGGATGCAGTC
3A25	GCCTTGTAAGGAACACAGATACCTCTGAATTTAGCAGACAGGACTTCTTCAACCGAAGAAACCCATTGTTCTAAGGTTTGCCACGGGATGCAGTC
CYP3AF	
CYP3AR	

Primers

>CYP3AF

AAAGGTTTCAGCAAGGAGAAACAAGG

>CYP3AR

GGAAGTGC TTGGCATGAG GTTT